



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103298836 B

(45)授权公告日 2017.03.08

(21)申请号 201280004805.2
(22)申请日 2012.01.06
(65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 103298836 A
(43)申请公布日 2013.09.11
(30)优先权数据
 2011-002394 2011.01.07 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2013.07.05
(86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2012/050136 2012.01.06
(87)PCT国际申请的公布数据
 W02012/093706 JA 2012.07.12
(73)专利权人 东亚合成株式会社
 地址 日本东京都
 专利权人 精工爱普生株式会社
(72)发明人 冈本雅次 花村雅人 福岛均
 吉田彻彦
(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事
 务所(普通合伙) 11277
 代理人 刘新宇 李茂家

(51)Int.Cl.
 C07K 16/28(2006.01)
 C07K 17/02(2006.01)
 G01N 33/53(2006.01)
(56)对比文件
 JP 07-132033 A,1995.05.23,第19段,序列
 1.
 JP 特表平7-505389 A,1995.06.15,摘要,
 第3页.
 JP 2005511047 A5,2005.04.28,第49-55
 段.
 JP 2005511047 A5,2005.04.28,第49-55
 段.
 E.Beck et al.Nucleotide sequence of
 the gene ompA coding the outer membrane
 protein II of Escherichia coli K-12.
 《Nucleic Acids Research》.1980,图2.
 Miraglia S et al.A novel five-
 transmembrane hematopoietic stem cell
 antigen: isolation, characterization, and
 molecular cloning.《BLOOD》.1997,图4A.

审查员 苗荻

权利要求书1页 说明书20页
序列表2页 附图8页

(54)发明名称
 用于获得抗疏水性肽抗体的抗原的制备方法

(57)摘要
 本发明的目的在于提供一种方法以获得针
 对疏水性肽的抗体,该疏水性肽可以容易地用于
 多种用途并且可靠性高。该制备抗原的方法的特
 征在于,在含有非离子表面活性剂的水溶液中将
 未结合至载体蛋白的疏水性肽用作高分子量聚
 集体。

1. 一种制备抗原的方法,其中长度为3至40个氨基酸的未结合至载体蛋白的疏水性肽在含有非离子表面活性剂的水溶液中转变为高分子量聚集体,且其中所述聚集体由非共价相互结合的几个或更多肽形成,从而形成分子量等于或大于10,000的分子,其中所述疏水性肽的序列为MLPGLALLLLAAWTARA,即SEQ ID NO:1,

FGGYQVNPYVGFEMGYDWLGRMPY,即SEQ ID NO:2或

FLFCWILMILVVLTFFVVGANVEK,即SEQ ID NO:3。

2. 根据权利要求1所述的制备抗原的方法,其中所述非离子表面活性剂为选自吐温20、吐温80、曲拉通X-100、Nonidet P-40、PEG12、PEG24、PEG60十二烷基醚和聚乙二醇胆固醇组成的组中的至少一种。

3. 根据权利要求1所述的制备抗原的方法,其中在含有所述非离子表面活性剂的水溶液中,所述高分子量聚集体具有分子量等于或大于100kDa的疏水性肽占总肽量的20质量%以上的分子量分布。

4. 根据权利要求2所述的制备抗原的方法,其中在含有所述非离子表面活性剂的水溶液中,所述高分子量聚集体具有分子量等于或大于100kDa的疏水性肽占总肽量的20质量%以上的分子量分布。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的制备抗原的方法,其包括以下步骤1)和2):

1) 在纯水中悬浮未结合至载体蛋白的疏水性肽;和

2) 在1)中获得的悬浮液中加入非离子表面活性剂。

6. 一种抗体的制备方法,其包括:

通过使用根据权利要求1~5任一项所述的方法制备抗原;和

通过使用所述抗原作为免疫原对非人类的哺乳动物免疫获得所述抗体。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述抗体为单克隆抗体。

8. 一种非诊断目的的检测样品中存在的抗原的方法,其包括:通过使用根据权利要求6所述的方法制备抗体,并使所述抗体接触样品的步骤。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述抗原为淀粉样前体蛋白信号肽,即SPAPP,以及其中所述抗体为抗淀粉样前体蛋白信号肽单克隆抗体,即抗SPAPP单克隆抗体。

用于获得抗疏水性肽抗体的抗原的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫工程学领域中制备抗原的方法。

[0002] 特别是,本发明涉及一种在不使用载体蛋白下采用疏水性肽作为免疫原,为获得抗疏水性肽抗体而制备抗原的方法。

背景技术

[0003] 由于抗体具有非常特异的分子识别能力和高亲和力,并且在待分析的靶分子中容易被制造的可能性高,所以几十年来,抗体一直被用作许多实验室中非常有用的研究试剂,并且实际上被用于从诊断剂到药剂的广泛应用中。在许多情况下,抗体的靶标是蛋白质,但是抗体也被用于如某种药物和环境污染物的低分子量靶标化合物的高灵敏度检测。

[0004] 在人类基因组分析完成后,近来,人们正积极地研究专注于人类的哺乳动物细胞中数万计的基因产物的表达状态和功能。数万至数十万计的蛋白质在组织和细胞中混合。为了检查这些蛋白质中特定的一种的表达状态和定位,抗体是至关重要的。在分化和组织再生以及癌细胞和干细胞的研究中,作为用于细胞分选(cell sorting) (其中不同功能的细胞从相同的群体中分级) 和用于理解分化控制的分化标记物的检测手段,抗体已变成不可缺少的工具。而且,抗体还经常用于特定蛋白质分子和特定疾病之间相关性的基础研究中。这些研究导致诊断剂的发展。抗体药物是由对特定蛋白质分子的中和作用和对疾病疗效的研究中发展起来的。如上所述,抗体在从基础研究到直接的实际应用的广泛应用范围内使用。

[0005] 为获得抗体,通常是用抗原免疫动物。抗原可以是天然的或人工的。对于天然抗原,使用纯化的靶蛋白质或者部分纯化或未纯化的含有靶蛋白质的混合物。另一方面,人工制备的抗原的主要类型分为以下两种:(i) 通过在合适的宿主中表达编码靶蛋白质或其片段的基因而制造的重组蛋白质,以及(ii) 靶蛋白质的一部分的氨基酸序列的合成肽。

[0006] 本文所用术语“肽”是指长度3至约40个氨基酸的肽。

[0007] 与从天然细胞或组织中纯化靶蛋白质的情况或者与利用重组基因表达的情况相比,如果将合成肽用作抗原,由于杂质更少,抗原制备所需的时间和工作量可以有利地显著减少。随着DNA测序技术的发展,目前很容易得到氨基酸序列信息,所以使用合成肽作为抗原的免疫被频繁运用。使用合成肽作为抗原的另一个优点在于可以选择蛋白质的特定区域。

[0008] 经常用作抗原的合成肽长度通常为10至25个氨基酸左右。为引起免疫反应,抗原必须同时结合至B细胞和II类T细胞(非专利文献1,P.72)。当用典型的免疫接种流程,即每一至两周给药一次进行免疫时,在对动物给药后,所述抗原必须在体内保留一定时间。所述抗原必须具有至少一定的分子量来满足这些需求,但是肽通常具有较小的分子量并且在给药后迅速代谢,因此并不直接用作抗原。

[0009] 即使获得特异性结合到肽的抗体,由于所述抗体对于含有肽序列的原蛋白并不一定具有良好的反应性,所以使用肽的免疫还是不利的(非专利文献1)。就此而言,将肽用作

抗原时比将靶蛋白质本身或其片段(分子量为约5000以上)用作抗原时获得目标抗体的可能性低,因此,通常试验两种或三种不同的肽抗原序列。

[0010] 关于应当选择靶蛋白质的哪个氨基酸序列作为肽抗原,绝对确定的方法仍然未知。作为通用的选择标准,应当避免可能被糖基化的位置(包括Asn-X-Thr基序的区域或富含Ser或Thr的区域),并选择亲水性程度相对高和可能显露于分子表面的部分,或者含有脯氨酸的位点或如 β -转角的弯曲部分(非专利文献1,非专利文献2)。

[0011] 引用列表

[0012] 专利文献

[0013] 非专利文献1:“Antibodies;A LABORATORY MANUAL,Ed HarIow&David Lane,CoId Spring Harbor Laboratory,1988”

[0014] 非专利文献2:Shinobu Ohmi,Kunio Tsujimura,Masaki Inagaki,“Experimental Protocol for Anti-Peptide Antibodies,”Shujunsha,1994

发明内容

[0015] 发明要解决的问题

[0016] 随着近来蛋白质X射线结构分析技术和通过NMR的溶液中蛋白质分子的结构分析技术的发展,已揭示了许多蛋白质分子结构。根据这些发现,蛋白质中含有高比例的亲水性氨基酸序列的部分(疏水性部分)几乎不溶于中性水溶液中并保持刚性分子结构。可以这么说,该部分作为刚性部分从而形成蛋白质分子立体结构的核心,并在蛋白质分子的完整性和个性(固有的立体结构)的形成中具有重要作用。

[0017] 蛋白质分子的疏水性部分赋予重要的分子间相互作用,如抗原-抗体反应、配体-受体结合、细胞内信号转导、脂质和低分子量疏水化合物的运输以及细胞间通讯。

[0018] 细胞是生命的基本单位并通过脂双层组成的膜结构与外界分离。高等生物的细胞膜结构不仅在细胞外周,而且还在细胞内,如细胞核、内质网、高尔基体和线粒体中具有大量在进化过程中发展出的复杂的膜结构,并且这些膜结构参与多种重要的细胞功能。膜结构构建了细胞的形状,并表达出参与到如分化和形态发生等高级生命活动中的独特功能。

[0019] 据估计细胞中所有蛋白质种类的27%是膜蛋白质,并且从被嵌入脂双层中的位置状态可以看出,膜蛋白质富含疏水性序列。关于膜蛋白质的整体结构,已知有1至12次跨膜类型(非专利文献3)。当膜穿透(penetrations)的次数越多,蛋白质中疏水性氨基酸的比例就越高。这些跨膜蛋白质与配体转移胞外信号至细胞的受体、神经递质和药物的受体以及运载体有关。而且,这些跨膜蛋白质参与如细胞间识别、分化和形态发生等的组织形成。

[0020] 至少60%以上的医药目前都针对膜蛋白(非专利文献4),并且已知多次跨膜膜蛋白质在脂双层中起作用,因此包含更高比例的疏水性部分。

[0021] 如上所述,迫切需要关于获得膜蛋白质的有用信息的研究,这必然增加有效制造实用的抗膜蛋白质抗体的需求。例如,NEDO(新能源和工业技术开发组织(New Energy and Industrial Technology Development Organization))正在进行称作“开发新功能抗体技术(Development of New Functional Antibody Technologies)”的研究(项目周期:FY2006至FY2010;FY2009预算:9亿日元;PL:Tatsuhiko Kodama),(教授,高等科学技术研究中心,东京大学),非专利文献5。

[0022] 非专利文献3:M.S.AImen等,BMC bioIogy7:50,doi:10.1186/1741-7007-7-50,该文章来自于:<http://www.biomedcentral.com/1741-7007/7/50>

[0023] 非专利文献4:P.F.SIivka等,ACS Chem.BioI.,2008,3 (7) ,pp.402-411

[0024] 非专利文献5:

[0025] <http://www.nedo.go.jp/activities/portaI/gaiyou/p06009/p06009.html>

[0026] 以下将描述其他已知方法。

[0027] 除膜蛋白质以外,在细胞外、细胞核内和其他亚细胞器中作用的蛋白质穿过细胞膜。至少一种信号肽和定位肽序列参与到细胞内运动的控制和这些蛋白质的新陈代谢中(O.Bakke和T.W.Nordeng,ImmunoI Rev.172:171-87,1999)。所述信号肽当中通常含有高疏水性部分。

[0028] 如上所述,认为高疏水性氨基酸序列埋于分子中,因此当选择候选序列用于抗肽抗体的生产时通常会被避开。即使合成了由疏水性氨基酸序列组成的肽,所述肽由于水溶性差而在中性水溶液中很难处理,并且在使用载体蛋白的交联反应中难以使用所述肽,因为这些问题,当选择抗原时,要更加避开所述疏水性氨基酸序列。因此,选择信号肽和膜蛋白质中含有高比例的高度疏水性氨基酸序列的序列部分作为免疫原的候选非常困难,所以,尽管很重要,但几乎从未制造过这种序列的抗体。

[0029] 另一个使得获得针对膜蛋白质的抗体困难的原因是,由于高等生物膜蛋白质的细胞外亲水部分经常糖基化,所以即使可以通过使用合成肽的免疫来制造识别合成肽的抗肽抗体,也通常无法识别天然抗原蛋白质。

[0030] 作为不使用合成肽来进行免疫的情况下的手段,可以通过完全合成或克隆蛋白质的cDNA,通过使用重组基因的cDNA在合适的宿主中表达蛋白,并纯化和在免疫中使用所获得的蛋白质来进行。然而,问题是该方法经常导致膜蛋白质的表达水平较低,并且所述膜蛋白质本身使得纯化相对困难。

[0031] 另一种免疫方法是称为DNA免疫的方法(非专利文献6)。该方法中,在克隆位点位于可以在用质粒DNA免疫的小鼠中表达的启动子下游的质粒载体中,克隆编码目的蛋白质的cDNA;然而,问题是免疫的成功率不是很高,以及该方法无法用于细胞内定位的膜蛋白质且耗费时间。

[0032] 尽管有在杆状病毒被膜中表达目的蛋白质,用于病毒颗粒免疫的方法,但该方法也耗费时间(非专利文献7)。

[0033] 尽管有通过使用重组病毒在合适的细胞中表达目的蛋白质从而在免疫中使用整个细胞的方法,但该方法需要特殊的技术以及相当大的工作量(非专利文献8)。

[0034] 肽自身由于其分子量太小而不适用于抗原,并由此必须增加分子量。因此,通常将肽和载体蛋白交联来用作抗原。在氨基和巯基之间交联的MBS(m-马来酰亚胺基苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯(m-MaIeimidobenzoyI-N-hydroxysuccinimide ester))以及在氨基和羧基之间交联的EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基碳化二亚胺盐酸盐)(1-ethyI-3-(3-dimethylaminopropyI carbodiimide hydrochloride))是已知的常用交联剂(非专利文献1)。戊二醛二酰亚胺酯(gIutaraIdehyde bisimide ester)也在一些情况中使用。这些反应在对于EDC为pH5左右以及对于其他试剂为pH7-8的水溶液中是可用的(非专利文献1)。由于在这种条件下,难溶或不溶的疏水性肽不能促成反应,所以不能成功产生结合物。

[0035] 报道的不使用抗原的载体蛋白的方法是MAP(多抗原肽)法,其中赖氨酸的氨基在肽合成期间用于分支从而合成八聚体(非专利文献9)。该方法的缺点在于合成的MAP肽在HPLC中不形成单峰并且不能纯化,如果氨基酸的数量等于或大于10,所述肽变得不可溶,而且滴定度通常不会增加(非专利文献10)。

[0036] 如上所述,至今还没有开发出以获得针对疏水性肽的抗体为目的可以通用的简单可靠的方法。

[0037] 非专利文献6:Takeshi Kobayashi, J. Biosci. Bioeng., volume 86, pp. 384-386 (2008)

[0038] 非专利文献7:<http://www.lsbm.org/staff/hamakubo.html>

[0039] 非专利文献8:<https://ruo.mbl.co.jp/custom/custom#sev.html>

[0040] 非专利文献9:Tam, J.P.: Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5409-5413 (1988)

[0041] 非专利文献10:Shinobu Ohmi, Kunio Tsujimura, Masaki Inagaki, "Experimental Protocol for Anti-Peptide Antibodies," Shujunsha, 1994

[0042] 用于解决问题的方案

[0043] 作为为解决上述问题而进行广泛研究的结果,发明人重点关注将疏水性肽在含有非离子表面活性剂的中性水溶液中悬浮。发明人发现,在这样的溶液中,含有高度疏水性序列的肽不溶解成单个分子,并且即使溶液在视觉上是透明的,所述肽也是以高分子量聚集体存在的。大部分的高分子量聚集体具有等于或大于10kDa的分子量,并且一些聚集体具有几nm至几十 μ m的粒径(直径)。在没有与载体蛋白产生结合的情况下当这种高分子量聚集体溶液用于除人之外的动物的直接免疫时,发明人惊奇地发现可以获得特异性识别抗原肽序列的抗体,由此完成了本发明。

[0044] 本发明具有以下构成:

[0045] (1) 一种制备抗原的方法,其中未结合至载体蛋白的疏水性肽在含有非离子表面活性剂的水溶液中转变为高分子量聚集体。

[0046] (2) 上述(1)的制备抗原的方法,其中所述非离子表面活性剂为选自聚氧乙烯(20)失水山梨醇单月桂酸酯、聚氧乙烯(20)失水山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯(8)辛基苯基醚、聚氧乙烯(9)辛基苯基醚、聚乙二醇(12)、聚乙二醇(24)、聚乙二醇(60)十二烷基醚和聚乙二醇胆固醇衍生物组成的组中的至少一种。

[0047] (3) 上述(1)或(2)的制备抗原的方法,其中在含有非离子表面活性剂的水溶液中20质量%以上的疏水性肽的高分子量聚集体具有等于或大于100kDa的分子量。

[0048] (4) 上述(1)至(3)的任一制备抗原的方法,其中所述疏水性肽为当加入至纯水中时形成具有分子量等于或大于10,000的聚集体的肽而非呈单体形式的肽。

[0049] (5) 上述(1)至(4)的任一制备抗原的方法,其中所述疏水性肽的序列为MLPGLALLLLAAWTARA (SEQ ID NO:1), FGGYQVNPVYVGFEMGYDWL GRMPY (SEQ ID NO:2) 或 FLFCWILMILVVLTFVVGANVEK (SEQ ID NO:3)。

[0050] (6) 上述(1)至(5)的任一制备抗原的方法,其包括以下步骤1)和2):

[0051] 1) 在纯水中悬浮未结合至载体蛋白的疏水性肽;和

[0052] 2) 在1)中获得的悬浮液中加入非离子表面活性剂。

[0053] (7)一种可通过使用上述(1)至(6)任一方法制备的抗原对非人类的哺乳动物免疫而获得的抗体。

[0054] (8)上述(7)的抗体,其中所述抗体为单克隆抗体。

[0055] (9)一种检测样品中存在抗原的方法,包括使上述(7)的抗体接触样品的步骤。

[0056] (10)上述(9)的方法,其中所述抗原为淀粉样前体蛋白信号肽(SPAPP,下文中有时简单地称为SPAPP),以及其中所述抗体为抗淀粉样前体蛋白信号肽单克隆抗体(抗SPAPP单克隆抗体)。

[0057] (11)一种制造抗体的方法,其包括对非人类的哺乳动物给药由上述(1)至(6)任一方法制备的抗原的步骤。

[0058] 发明的效果

[0059] 根据本发明的方法,通过使用预期具有较差抗原性以及由于在水溶液中处理较困难而已经避开很多年的疏水性肽,来获得针对所述疏水性肽的抗体。根据本发明的方法,由于不需要使载体蛋白与疏水性肽结合以产生结合物的成本和时间,所以提高了经济效率。如果使用载体蛋白进行免疫,不可避免地产生针对载体蛋白的抗体;然而,本发明的方法中不使用载体蛋白,因此,可以高效地获得目的抗体。

[0060] 由于本发明能够获得针对疏水性肽的抗体,可以获得先前未得到的疏水性信号肽和膜蛋白质在生理功能方面如代谢途径、亚细胞定位和相互作用伴侣(interaction partner)的新的有用信息。用这种方式获得的有用信息极有可能有助于对细胞功能的理解以及诊断剂和药剂的研发。尽管以常规方式获得针对膜蛋白质的抗体十分困难,但本发明将有效和显著地减少工作量和成本。

附图说明

[0061] 图1描述了纯化的SPAPP的HPLC色谱图。

[0062] 图2描述了纯化的SPAPP的LC-MS色谱图。

[0063] 图3描述了使用用本发明方法免疫的20只小鼠的血清(500倍稀释)的SPAPP的斑点印迹。

[0064] 图4描述了由Countess(注册商标)测量的用于免疫的SPAPP/1%吐温20悬浮液中的粒径分布。

[0065] 图5描述了用于免疫的SPAPP/1%吐温20悬浮液中肽聚集体的分子量分布的测量流程。

[0066] 图6描述了非离子表面活性剂中SPAPP的分子量分布。A:在纯水中悬浮SPAPP后迅速混合表面活性剂。B:在纯水中悬浮SPAPP并在室温下静置90分钟后加入表面活性剂。

[0067] 图7描述了使用用本发明方法免疫的30只小鼠的血清(10,000倍稀释)的SPAPP的EIA的滴定度检测结果。

[0068] 图8描述了使用图7(A)6号、(B)10号、(C)15号三个个体血清的人神经母细胞瘤SK-N-SH细胞的免疫荧光染色。

[0069] 图9描述了使用根据本发明获得的抗SPAPP单克隆抗体CM61的SPAPP的斑点印迹的滴定度检测结果。

[0070] 图10描述了使用根据本发明获得的抗SPAPP单克隆抗体(10种类型)的SPAPP的EIA

的滴定度检测结果。

[0071] 图11描述了肽FCG24和FLF23的1%吐温20悬浮液的粒径分布。(A) 1%吐温20悬浮液中的肽FCG24的Countess (注册商标) 测量结果。(B) 1%吐温20悬浮液的动态光散射粒径分析仪的测量结果。(C) 1%吐温20悬浮液中肽FLF23的动态光散射粒径分析仪的测量结果。

[0072] 图12描述了使用由肽FCG24 (A) 和FLF23 (B) 的1%吐温20悬浮液免疫的小鼠血清的抗原肽的EIA的滴定度试验结果。

[0073] 图13描述了使用根据本发明获得的抗SPAPP单克隆抗体CM6在添加有SPAPP的人血浆中检测SPAPP的结果。

具体实施方式

[0074] (疏水性肽)

[0075] 用作本发明制备抗原的方法中的抗原的肽可以是任意肽,只要所述肽是疏水性肽并且特征在于,所述肽为未结合至载体蛋白的疏水性肽即可。换句话说,本发明制备抗原的方法是仅使用疏水性肽作为抗原而不使用载体蛋白的方法。

[0076] 通过检查靶蛋白的氨基酸序列来基本获知要用作本发明抗原的肽的亲水性/疏水性谱图(profile)。可以在网站(如ProtScale of ExPASy Proteomics tools (HYPERLINK “<http://expasy.org/tools/protScale.html>” <http://expasy.org/tools/protScale.html>))和市售的基因分析软件(如GENETYX Corporation的基因信息处理软件“GENETYX”)检查氨基酸序列。本发明中使用的疏水性肽是基于疏水性/亲水性的分析结果而确定为疏水性的肽,并且严格来说,是当与纯水混合时形成具有分子量为10,000以上的聚集体的肽而非呈单体形式的肽。聚集体的存在和大致的分子量分布可以通过用截留分子量(molecular weight cutoff)为10,000的超滤离心装置(如Amicon Ultra-0.5和PLGC Ultrace I-10膜)处理肽溶液并比较原溶液和渗透液之间的肽浓度来确定。聚集体的存在和大致的分子量分布也可以通过使用具有适当馏分范围(proper fraction range)的凝胶过滤柱的HPLC来分析。

[0077] 用作本发明抗原的疏水性肽可以通过F-MOC-法肽合成仪合成,然后通过C18HPLC柱用乙腈浓度梯度分离、纯化和分级。这些流程可以委托给合成肽的合同制造商。本说明书中,针对肽的抗体是指“抗肽抗体”,并且特别是,当限定为针对疏水性肽的抗体时是指“抗疏水性肽抗体”。

[0078] (疏水性肽聚集体)

[0079] 用作本发明的抗原可以是任意疏水性肽,只要所述疏水性肽在含有非离子表面活性剂的中性水溶液中形成高分子量聚集体即可。尽管聚集体的聚集程度和粒径会根据用作抗原的肽的疏水性序列而变化,但大部分肽聚集体更优选具有10,000至20,000以上的分子量。在可操作范围内的较大分子量是更需要的。本说明书中,由肽非共价相互结合形成的聚集体作为整体可以被称为“分子”,并且含有聚集体状态的肽的溶液可以称为“溶液”或“悬浮液”。如后面的实例所述,根据本发明制备抗原的方法,认为单独的疏水性肽是抗原,并且可以在疏水性肽和载体蛋白之间不产生结合物的情况下获得针对肽的抗体(也指抗肽抗体)。换句话说,如果几个或更多肽在水溶液中形成聚集体从而形成分子量等于或大于约10,000的分子,则将所述肽认作免疫反应中的抗原,并且可以获得针对所述抗原的抗体。如

上所述,根据本发明的方法,疏水性肽的抗体(也指抗疏水性肽抗体)的获得与非离子表面活性剂的类型无关,不用将其浓度限定到特定浓度,并且也不用限定针对具体氨基酸序列的靶标。

[0080] (制备抗原的方法)

[0081] 本发明制备抗原的方法是通过以下步骤进行的,例如。

[0082] 1) 将疏水性肽加入至纯水中并通过搅拌器充分混合,并且如果不透明,使用超声使其部分透明。

[0083] 2) 将非离子表面活性剂加入至1)获得的疏水性肽的纯水悬浮液中,从而制造疏水性肽的高分子量聚集体。

[0084] 具有等于或大于10,000 (10kDa) 分子量的高分子量聚集体必须占分子量分布的大部分。优选地,期望制备悬浮液从而使这些具有等于或大于10,000 (10kDa) 分子量的高分子量聚集体占总肽质量的20质量%以上。通过使凝胶过滤或使用离心式分子量截留膜与BCA或蛋白质(肽)浓度测定组合(如实施例所示),或者通过非变性PAGE (Native PAGE) 可以大致掌握分子量分布。

[0085] 所期望的高分子量聚集体包括粒径分布在1 μ m至100 μ m的颗粒。粒径分布可以通过如动态光散射粒径分析仪等的利用动态光散射的装置检查或如CountessTM (Invitrogen) CouIter计数器等的细胞计数器来检查。

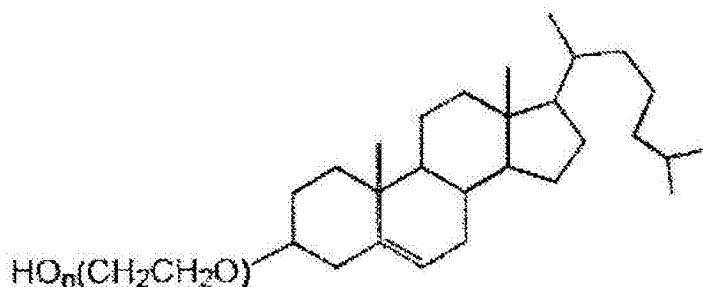
[0086] 在纯水中悬浮疏水性肽后直到添加表面活性剂的时间影响随后的聚集体分子量分布。因此,如果表面活性剂的添加没有间隔,所述聚集体的分子量分布趋向于更低,并且如果在纯水悬浮液状态中有足够的间隔,所述聚集体趋向于向分子量更高侧分布。疏水性肽聚集体的粒径分布可以以这种方式控制。

[0087] (非离子表面活性剂)

[0088] 用于制造本发明的疏水性肽的高分子量聚集体的表面活性剂可以是任意的非离子表面活性剂,并且包括,例如,聚氧乙烯(20)失水山梨醇单月桂酸酯(吐温20)、聚氧乙烯(20)失水山梨醇单油酸酯(吐温80)、聚乙二醇(12) (PEG12)、聚乙二醇(24) (PEG24)、聚乙二醇(60) (PEG60) 十二烷基醚、由下列通式表示的聚乙二醇胆固醇衍生物、聚氧乙烯(8)辛基苯基醚(曲拉通(Triton) X-100)、聚氧乙烯(9)辛基苯基醚(诺乃(Nonidet) P-40)、 β -辛基葡萄糖苷、十二烷基- β -D-麦芽糖苷和如下所述的市售非离子表面活性剂。这些表面活性剂中,优选使用聚氧乙烯(20)失水山梨醇单月桂酸酯、聚氧乙烯(20)失水山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯(8)辛基苯基醚、聚氧乙烯(9)辛基苯基醚、聚乙二醇(12)、聚乙二醇(24)、聚乙二醇(60)十二烷基醚或聚乙二醇胆固醇。用于本发明中的非离子表面活性剂可以加入至悬浮于纯水中的疏水性肽的溶液中,或者可以在加入疏水性肽之前制备非离子表面活性剂水溶液,从而制备疏水性肽的高分子量聚集体。疏水性肽的高分子量聚集体的分子量分布也根据疏水性肽的序列、非离子表面活性剂的类型或非离子表面活性剂的浓度而变化。非离子表面活性剂的浓度可以在任何允许疏水性肽的高分子量聚集体的广泛粒径分布的范围内,并且例如,优选大致从0至2质量%的范围。

[0089] [化学式1]

[0090]



[0091] (市售非离子表面活性剂的实例)

[0092] N,N-双(3-D-葡萄糖酰胺丙基)胆固醇酰胺(N,N-Bis(3-D-gluconamidopropyl)choleamide) [BIGCHAP], Dojindo实验室;

[0093] 342-05611N,N-双(3-D-葡萄糖酰胺丙基)脱氧胆固醇酰胺(N,N-Bis(3-D-gluconamidopropyl)deoxycholeamide) [Deoxy-BIGCHAP], Dojindo实验室;

[0094] 149-05701NIKKOL BL-9EX [聚氧乙烯(9)月桂酰基醚], Wako特级;

[0095] 348-05071辛酰基-N-甲基葡萄糖酰胺[MEGA-8], Dojindo实验室;

[0096] 345-05081壬酰基-N-甲基葡萄糖酰胺[MEGA-9], Dojindo实验室;

[0097] 342-05091癸酰基-N-甲基葡萄糖酰胺[MEGA-10], Dojindo实验室;

[0098] 348-05093, Dojindo实验室;

[0099] 164-19881聚氧乙烯(8)辛基苯基醚[曲拉通X-114], 生物化学用;

[0100] 161-19911聚氧乙烯(9)辛基苯基醚[NP-40], 生物化学用;

[0101] 168-11805聚氧乙烯(10)辛基苯基醚[曲拉通X-100];

[0102] 163-11512聚氧乙烯(20)失水山梨醇单月桂酸酯[吐温20];

[0103] 160-11522聚氧乙烯(20)失水山梨醇单棕榈酸酯[吐温40];

[0104] 167-11532聚氧乙烯(20)失水山梨醇单硬脂酸酯[吐温60];

[0105] 164-11542聚氧乙烯(20)失水山梨醇单油酸酯[吐温80];

[0106] 161-11552聚氧乙烯(20)失水山梨糖醇三油酸酯Pr.G.;

[0107] 160-11561聚氧乙烯(23)月桂酰基醚[Brij35];

[0108] 533-80981CALBIOCHEM;

[0109] 167-11571聚氧乙烯(20)十六烷基醚[Brij58];

[0110] 341-06161正十二烷基-β-D-吡喃麦芽糖苷(n-Dodecyl-β-D-maltopyranoside), Dojindo实验室;

[0111] 346-05371正庚基-β-D-硫代吡喃葡萄糖苷, Dojindo实验室;

[0112] 340-05031正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷, Dojindo实验室;

[0113] 349-05361正辛基-β-D-硫代吡喃葡萄糖苷, Dojindo实验室;

[0114] 343-06861正壬基-β-D-硫代麦芽糖苷, Dojindo实验室;

[0115] 043-21376毛地黄皂苷, 生物化学用; 和

[0116] 192-08851皂角甙, 来自大豆, Wako一级。

[0117] (免疫)

[0118] 可以按照本领域技术人员通常进行的技术进行免疫。可以进行血液收集以测量血清滴定度, 并且可以延长免疫周期。血清滴定度可以通过抗原肽的斑点印迹或使用涂覆有抗原肽结合物的板或涂覆有抗原肽的板的EIA来检查。血清滴定度也可以根据目的通过蛋

白质印迹或免疫染色来检测。尽管本发明的免疫原通过将疏水性肽加至非离子表面活性剂来获得聚集体而非使用载体蛋白的方法制备,但明显的是,这并不排除在制备用于测量抗体滴定度的涂覆有抗原肽结合物的板或涂覆有抗原肽的板时使用载体蛋白和肽之间的结合物。

[0119] (单克隆抗体)

[0120] 将描述从通过使用由上述制备抗原的方法获得的疏水性肽的高分子量聚集体作为抗原进行免疫的哺乳动物获得针对疏水性肽的单克隆抗体的方法。

[0121] 尽管如豚鼠、大鼠、小鼠、兔和羊等实验动物用作要免疫的哺乳动物,但优选大鼠、小鼠和兔来获得单克隆抗体或多克隆抗体。尽管例如皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内或皮内途径等任意给药途径可以用于免疫方法中,但主要优选皮下、腹膜内或静脉注射抗原。免疫间隔和免疫剂量等并不特别限定,并且可以使用各种方法。然而,在很多情况下,例如,每隔2周进行总计约2至10次的免疫,并且最后一次免疫之后(优选地,约2至7天后),从活体收集样品约1至5次。尽管不限定每次给药的肽量,但免疫剂量优选为每只小鼠约10至200 μ g的肽。初次免疫,将疏水性肽的高分子量聚集体和佐剂(例如弗式完全佐剂)充分混合并腹膜内给药至小鼠以使细胞生长;再次将高分子量聚集体和佐剂(例如弗式不完全佐剂)充分混合并每隔2周腹膜内给药;并可随后收集血液、腹水和抗体产生细胞,从而有效获得高滴定度的抗疏水性肽的单克隆或多克隆抗体。目的单克隆抗体或多克隆抗体可以通过如亲和层析、离子交换层析、凝胶过滤和硫酸铵沉淀等已知方法来纯化。

[0122] 将对使用通过生产针对疏水性肽的抗体的方法获得的抗体基于抗原-抗体反应来检测来自样品的目标疏水性肽的方法进行描述。所述样品可以是任意形式,并且可以由例如血液上清、血清、血浆、淋巴液、尿、脑脊髓液、唾液、汗液、腹水、羊膜液或者细胞或器官的提取液制备的生物样品。所述生物样品可以根据所需合适地处理。例如,对于由细胞分离或提取操作获得的样品,如免疫组织化学染色、酶免疫测定、凝集法、竞争法和夹层法等已知方法是适用的。例如,免疫组织化学染色可以通过使用标记抗体的直接方法或使用通过标记针对所述抗体的抗体而获得的抗体的间接方法来进行。如荧光材料、放射性物质、酶、金属和染料等任何已知的标记物质可以用作标记剂。

[0123] (结合物)

[0124] 本文所用术语“结合物”指通过在载体蛋白和抗原肽之间的化学交联获得的复合体。通常,当肽用作抗原时,为了增加周转时间(turnover time),将所述抗原化学交联至具有引起结合至II类T细胞作用的载体蛋白并用作结合物(非专利文献1)。KLH(钥孔虫咸血蓝素(keyhole-limpet hemocyanin))、BSA(牛血清白蛋白)、卵清蛋白等被用作载体蛋白(非专利文献1)。

[0125] 为了交联,使用MBS(m-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯)、NHS(N-羧基琥珀酰亚胺酯)、EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺)、戊二醛等。在MBS的情况中通过使半胱氨酸残基的-SH和氨基、在NHS的情况中通过氨基和氨基、在EDC的情况中通过氨基和羧基或在戊二醛的情况中通过氨基相互(之间形成亚胺键)共价键合而实现交联而实现。为了促成这些交联,需要游离官能团。

[0126] 实施例

[0127] [试验例1]

[0128] 疏水性肽SPAPP(淀粉样前体蛋白信号肽)的合成、纯化和精确质量确认。

[0129] 将由第一(1)至第十七(17)位点的序列(SEQ ID NO:1)组成的肽MLPGLALLLLAAWTARA-COOH(其被认为是人淀粉样前体蛋白A4的信号肽)委托给GL Biochem(上海)有限公司进行合成和纯化。根据HPLC峰面积比,纯化的多肽的纯度为92%至94%(图1)。关于分子量,从LC-MS(ESI模式)观察到891.5的二价离子信号或1781的单价离子信号(图2),表明1781的质量。这与由氨基酸序列计算的分子量一致,并确认所述肽为目的肽。

[0130] [试验例2]

[0131] 肽SPAPP在各种溶剂中的溶解度试验

[0132] (1)以各种浓度将粉末状纯化的SPAPP混合于各种溶剂从而检查溶解度。表1示出了试验条件和结果。

[0133] 以下描述中所述术语“可溶”是指溶剂为目视透明的状态,以及“不溶”是指溶剂为目视浑浊的状态。

[0134] [表1]

[0135]

| 溶剂分类 | 溶剂名称 | SPAPP浓度 | 溶解度 |
|-------------|-------------------------------------|-----------|-----|
| 中性水溶液 | 纯水 | 0.1 mg/ml | 不溶 |
| | 磷酸盐缓冲液(pH7) | | 不溶 |
| 强酸性水溶液 | 0.1%三氟乙酸(pH2.0) | 7.5 mg/ml | 可溶 |
| | 1%甲酸(pH3.0) | 0.5 mg/ml | 可溶 |
| 有机溶剂 | 100% 甲醇 | 0.5 mg/ml | 可溶 |
| | 100% DMSO | 50 mg/ml | 可溶 |
| | 100% DMF | 20 mg/ml | 可溶 |
| 表面活性剂(阴离子性) | 1% SDS | 1~5 mg/ml | 可溶 |
| (非离子性) | 1% 吐温20 | 1~5 mg/ml | 可溶 |
| (非离子性) | 1% 吐温80 | 1~5 mg/ml | 可溶 |
| (非离子性) | 1% 曲拉通X-100 | 1~5 mg/ml | 可溶 |
| (非离子性) | 1% 诺乃P40 | 1~5 mg/ml | 可溶 |
| (非离子性) | 1% PEG12 | 1~5 mg/ml | 可溶 |
| (非离子性) | 1% PEG24 | 1~5 mg/ml | 可溶 |
| (非离子性) | 1%PEG60十二烷基醚 | 1~5 mg/ml | 可溶 |
| (非离子性) | 1% 胆固醇-PEG (NOF CORPORATION CS050号) | 1~5 mg/ml | 可溶 |

[0136] (2) 结果和讨论

[0137] (i) 中性水溶液

[0138] SPAPP在中性水溶液中变浑浊并且完全不可溶。

[0139] (ii) 强酸性水溶液

[0140] SPAPP在强酸性水溶液中的等电点为10.9并且可溶。

- [0141] (iii) 有机溶剂
- [0142] SPAPP在极性有机溶剂中可溶。
- [0143] (iv) 含有表面活性剂的中性水溶液
- [0144] SPAPP在含有极性和非离子表面活性剂的中性水溶液中可溶。
- [0145] (v) 从这些结果,认为虽然SPAPP在中性水溶液中不溶并且由于高疏水性形成造成溶液浑浊的大的聚集体,而通过水合SPAPP的分子(即表面活性剂)的介导,SPAPP即使在中性水溶液中也变得可溶。这种状态中,如后描述,即使水溶液是目视透明的,SPAPP在水溶液中也以高分子量聚集体而存在。
- [0146] 尽管所述疏水性肽在含有极性表面活性剂的水溶液中可溶,然而使用该溶液免疫未获得抗体(数据未示出),因此,认为优选使用非离子表面活性剂作为表面活性剂。所述强酸性水溶液和有机溶剂为参考实例。
- [0147] [试验例3]
- [0148] 使用斑点印迹的抗体滴定度测量试验法
- [0149] (1) 按照以下流程进行斑点印迹。
- [0150] (i) 以1 μ I/斑点用SPAPP的1%吐温20溶液点样硝酸纤维素膜,并用1%脱脂乳/TBST或Starting Block (TBS) 封闭缓冲液在室温下封闭硝酸纤维素膜一小时以上。
- [0151] (ii) 要检查滴定度的血清用0.2%脱脂乳/TBST稀释400至500倍,加入至点样有SPAPP的硝酸纤维素膜,并在室温(20至24 $^{\circ}$ C)下震荡一小时进行第一抗体反应。
- [0152] (iii) 通过用0.2%脱脂乳/PBST洗涤硝酸纤维素膜3次来除去没有结合的未反应抗体,每次5分钟。
- [0153] (iv) 通过将硝酸纤维素膜与用0.2%脱脂乳/TBST稀释4000倍的第二抗体震荡一小时来引起第二抗体反应。
- [0154] (v) 用0.2%脱脂乳/TBST洗涤硝酸纤维素膜3次,每次5分钟。
- [0155] (vi) 添加碱性磷酸酶底物溶液从而在室温下引起颜色反应30分钟并且通过用纯水洗涤来终止反应。
- [0156] (2) 材料和试剂
- [0157] 第二抗体
- [0158] 小鼠血清的情况:抗小鼠IgG (Fc特异性) 碱性磷酸酶结合物(Sigma No.A-2429)
- [0159] 兔血清的情况:山羊多克隆抗兔免疫球蛋白AP (DAKO No.D0487)
- [0160] 碱性磷酸酶底物溶液:Thermo Scientific,34042号1-Step NBT/BCIP
- [0161] TBS:10mM Tris-HCl pH7.5,0.1M NaCl
- [0162] TBST:TBS+1%吐温20
- [0163] 硝酸纤维素膜:Hybond-ECL,由GE Healthcare制造。
- [0164] Starting Block (TBS) 封闭缓冲液:37542号,由Thermo Scientific制造。
- [0165] [比较例]
- [0166] 通过使用各种结合物作为免疫原而获得的血清(多克隆抗体)的滴定度的测量(常规方法)。
- [0167] 生产SPAPP和各种载体蛋白之间的结合物,从而使用在免疫中利用这些结合物所获得的血清来测量滴定度。

[0168] (1) SPAPP/KLH结合物

[0169] (1-1) 结合物的生产

[0170] 通过将2.5mg KLH(Wako Pure Chemical Industries有限公司,免疫化学用,08607663号)溶解于66 μ I的1.5M的NaCl中并混合70 μ I1M的MES缓冲液(pH4.5)和565.5 μ I的纯水,制备的KLH溶液终浓度为3.77mg/mI。通过将SPAPP溶解于100%的DMSO中直至浓度为7.5mg/mI来制备SPAPP溶液。用纯水制备33mg/mI的EDC溶液。将这些溶液按以下体积和顺序混合并在23 $^{\circ}$ C下静置15小时。混合后反应液迅速变浑浊。

[0171] KLH溶液 270 μ I (1017 μ g)

[0172] SPAPP溶液 180 μ I (1315 μ g)

[0173] EDC溶液 30 μ I

[0174] 为了猝灭未反应氨基,加入30 μ I1M的Tris-HCl(pH7.0)。将溶液用PBS稀释2倍,分装成10管并储存于-30 $^{\circ}$ C下直到免疫。

[0175] (1-2) 免疫

[0176] 通过将抗原与等体积的完全弗式佐剂(仅初次免疫)或不完全弗式佐剂混合,并一次给两只兔皮下注射相当于约120 μ g量的抗原肽来进行免疫。从初次免疫日期0天开始每两周进行免疫(总计四次)。在49天采取血样并通过斑点印迹试验检测血清滴定度。

[0177] (1-3) 结果

[0178] 未检测到对SPAPP的抗体滴定度。可能的原因是由于反应溶液组成不适于维持SPAPP的溶解状态,结合物的产生不够充分。

[0179] (2) SPAPP/EWA结合物

[0180] (2-1) 结合物的生产

[0181] 由于KLH作为载体蛋白具有低溶解度,所以选择高度可溶的蛋清抗生物素蛋白(EWA,Wako Pure Chemical Industries有限公司,017-21011号)。将EWA溶解于纯水至25mg/mI,从而制备EWA水溶液,并随后用以下组成制备SPAPP/EWA DMSO溶液。

[0182] (i) EWA DMSO溶液

[0183] 100%DMSO 280 μ I

[0184] 1M MES缓冲液(pH4.5) 35 μ I

[0185] EWA水溶液 50 μ I

[0186] (ii) SPAPP DMSO溶液

[0187] 7.5mg/mI SPAPP/100%DMSO 135 μ I

[0188] 1M MES缓冲液(pH4.5) 50 μ I

[0189] 纯水 50 μ I

[0190] 将这些溶液按以下体积和顺序混合并在23 $^{\circ}$ C下静置15小时。反应溶液变得略微浑浊。为了猝灭未反应氨基,加入30 μ I1M的Tris-HCl(pH7.0)。将溶液用PBS稀释2倍,分装成10管并储存于-30 $^{\circ}$ C下直到免疫。

[0191] (iii) SPAPP/EWA结合物溶液

[0192] EWA DMSO溶液 365 μ I

[0193] SPAPP DMSO溶液 250 μ I

[0194] 33mg/mI EDC 30 μ I

[0195] (2-2) 免疫

[0196] 通过将抗原与等体积的完全弗式佐剂 (仅初次免疫) 或不完全弗式佐剂混合, 并一次给两只兔皮下注射相当于约120 μ g量的抗原肽来进行免疫。从初次免疫日期0天开始每两周进行免疫 (总计四次)。在49天采取血样并通过斑点印迹试验检查血清滴定度。

[0197] (2-3) 结果

[0198] 未检测到对SPAPP的抗体滴定度。可能的原因是由于反应溶液组成不适于维持SPAPP的溶解状态, 结合物的产生不够充分。

[0199] (3) SPAPP/HRP结合物

[0200] (3-1) 结合物的生产

[0201] 将辣根过氧化物酶 (HRP, Wako Pure Chemical Industries有限公司, 169-10791号) 溶解于纯水中至50mg/ml。为了除去不溶性杂质, 15,000rpm下离心10分钟后收集上清。为了除去降解的蛋白质, 使用截留分子量为5,000的离心式过滤装置 (Amicon YM-5) 来洗涤三次。

[0202] (i) HRP DMSO溶液

| | |
|------------|-------------|
| 100 % DMSO | 280 μ l |
|------------|-------------|

| | |
|----------------------|------------|
| 1 M MES 缓冲液 (pH 4.5) | 35 μ l |
|----------------------|------------|

[0203]

| | |
|-----|------------|
| HRP | 44 μ l |
|-----|------------|

| | |
|----|-----------|
| 纯水 | 6 μ l |
|----|-----------|

[0204] (ii) SPAPP DMSO溶液

| | |
|--------------------------------|-------------|
| [0205] 7.5mg/ml SPAPP/100%DMSO | 135 μ l |
|--------------------------------|-------------|

| | |
|--------------------------|------------|
| [0206] 1M MES缓冲液 (pH4.5) | 50 μ l |
|--------------------------|------------|

| | |
|-----------|------------|
| [0207] 纯水 | 50 μ l |
|-----------|------------|

[0208] 将这些溶液按以下体积和顺序混合并在23 $^{\circ}$ C下静置15小时。反应溶液变得略微浑浊。为了猝灭未反应氨基, 加入30 μ l 1M的Tris-HCl (pH7.0)。将溶液用PBS稀释2倍, 分装成10管并储存于-30 $^{\circ}$ C下直到免疫。

[0209] (iii) SPAPP/HRP结合物溶液

| | |
|-------------------|-------------|
| [0210] HRP DMSO溶液 | 365 μ l |
|-------------------|-------------|

| | |
|---------------------|-------------|
| [0211] SPAPP DMSO溶液 | 250 μ l |
|---------------------|-------------|

| | |
|--------------------|------------|
| [0212] 33mg/ml EDC | 30 μ l |
|--------------------|------------|

[0213] (3-2) 免疫

[0214] 通过将抗原与等体积的完全弗式佐剂 (仅初次免疫) 或不完全弗式佐剂混合, 并一次给两只兔皮下注射相当于约120 μ g量的抗原肽来进行免疫。从初次免疫日期0天开始每两周进行免疫 (总计四次)。在49天采取血样并通过斑点印迹试验检查血清滴定度。

[0215] (3-3) 结果

[0216] 未检测到对SPAPP的抗体滴定度。可能的原因是由于反应溶液组成不适于维持SPAPP的溶解状态, 结合物的产生不够充分

[0217] (4) SPAPP/OVA结合物

[0218] 按照(ii)所述的流程在SPAPP和卵清蛋白(缩写为OVA)之间诱导结合反应,从而由(i)所述的SPAPP/OVA溶液制备SPAPP/OVA结合物溶液。

[0219] (i) SPAPP/OVA溶液

[0220] 10M尿素,20mM磷酸盐缓冲液 1320 μ I

[0221] 20mg/mI SPAPP(纯度:94.38%),DMSO溶液 300 μ I

[0222] 20mg/mI卵清蛋白(CaIbiochem,#32467),10M尿素,

[0223] 20mM磷酸盐缓冲液 300 μ I

[0224] 20%吐温20 120 μ I

[0225] DW 60 μ I

[0226] 总计 2100 μ I

[0227] (ii) 流程

[0228] 1.在加热至95 $^{\circ}$ C的干燥机内预温育(i)的溶液20分钟后,涡旋加入62.5mM BS3(Thermo Fisher Scientific)/20mM的磷酸盐缓冲液作为交联剂直至300 μ I。

[0229] 2.然后将溶液在95 $^{\circ}$ C下温育2小时。

[0230] 3.随后,加入120 μ I的1M Tris-HCl(pH7)以在室温下猝灭未反应的BS3达30分钟。

[0231] 4.滴加3的溶液至7,080 μ I PBS。

[0232] [实施例1]

[0233] 本发明的使用抗原的抗体获得(1),多克隆抗体

[0234] 使用SPAPP悬浮于含有非离子表面活性剂的溶剂中的溶液作为免疫原的直接免疫法获得血清,通过使用该血清的斑点印迹测量滴定度。

[0235] (1) 抗原的制备——SPAPP/1%吐温20

[0236] 称取纯度92%的六(6)mg SPAPP并悬浮于5.4mI纯水中。这时,SPAPP在水溶液中完全不溶并且变浑浊。将所述溶液以该状态静置约3小时,并加入0.6mI10%吐温20并混合。SPAPP的终浓度为2mg/mI。通过功率水平为7的TOMY SEIKO Handy Sonic Model UR-20间歇地施加超声波,总计约3分钟。施加超声震动直至透明度提高至一定程度并且600nm的吸光度达到约0.2。将所得SPAPP溶液分装成10管并储存于-30 $^{\circ}$ C下直至马上用于免疫之前。

[0237] (2) 免疫

[0238] 通过将(1)制备的SPAPP溶液与等量完全弗式佐剂或不完全弗式佐剂混合,并给20只BaIb/c小鼠每只皮下注射20 μ g来进行免疫。每隔两周按时进行免疫,共计六次,并且从抗原给药一周后,根据需要收集中间血液样品或全血。

[0239] (3) 斑点印迹

[0240] 调整SPAPP的浓度从而使试验例3所述的斑点印迹的每个斑点包含10或100ng,并且将由(2)获得的20只小鼠的血清稀释至500倍以测量滴定度。

[0241] (4) 结果

[0242] 结果示于图3中,20只小鼠中有约一半的血清可检测到十(10)ng的SPAPP。因此,通过使用免疫用无结合的SPAPP悬浮液,获得了对SPAPP有充分反应性的血清(多克隆抗体)。

[0243] [实施例2]

[0244] SPAPP的粒径分布和分子量分布

[0245] (1) 粒径分布的测量

[0246] 用于上述免疫方法的SPAPP/1%吐温20悬浮液的粒径分布如下测量。将SPAPP悬浮液(2mg/ml)和等量的0.4%的台盼蓝溶液混合后,将溶液施加到细胞计数装置Countess(注册商标)(由INVITROGEN制造)。该设备中可以测量2 μ m至80 μ m的颗粒。

[0247] (2)因此,SPAPP在悬浮液中的粒径分布为2至60 μ m,以及浓度为 3.2×10^6 /ml。大多数具有几 μ m尺寸。图4显示出了分子量分布的测量结果。

[0248] 按照以下流程测量悬浮液中SPAPP聚集体的分子量分布。图5显示出该流程的大纲。

[0249] (i)将所述悬浮液在15,000rpm下离心5分钟并分成上清和沉淀。该离心使等于或大于约1 μ m的颗粒沉淀。

[0250] (ii)将所述上清施加分子量100,000的截留旋转过滤器(Amicon Microcon YM-100)并通过离心使其通过过滤器。

[0251] (iii)将(ii)的流过溶液施加到截留分子量100,000的旋转过滤器并通过离心使其通过过滤器。

[0252] 上述过程的每个阶段中,使用BSA作为标准通过BCA蛋白质测定仪(Thermo Fisher Scientific)来测量溶液的蛋白质浓度。

[0253] 结果,由于通过初次离心上清的蛋白质浓度降至约原溶液的一半,发现等于或大于1 μ m的颗粒(不溶部分)占总蛋白质量的约一半(48质量%)。也发现残余物为分子量10,000至100,000(10至100kDa)占20质量%的那些颗粒和分子量等于或大于100,000(100kDa)占33质量%的那些颗粒(表2)。

[0254] [表2]

[0255] SPAPP/1%吐温20悬浮液中肽聚集体的分子量分布

[0256]

| MV | 小于10kDa | 10-100 kDa | 100 kDa以上 | 不溶(沉淀) |
|------|---------|------------|-----------|--------|
| 肽质量比 | 0% | 20% | 33% | 48% |

[0257] (3)结论

[0258] 发现当将由17个氨基酸组成并具有1781的分子量的SPAPP作为单体投入含有上述表面活性剂的水溶液中处于悬浮状态时,分子量分布和粒径分布广泛。

[0259] [实施例3]

[0260] 聚集体的分子大小(分子量/粒径)分布的试验

[0261] (1)聚集体在纯水中的静置时间和分子大小分布之间的关系

[0262] 改变从在纯水中悬浮SPAPP到添加各种表面活性剂的时间,从而确定聚集体的分子大小分布根据时间变化。例如,在1%吐温20的情况下,当在纯水中悬浮SPAPP后迅速加入表面活性剂时,不溶部分(沉淀)为5%,当在1.5小时后加入时为17%,以及当在3小时后加入时为48%。

[0263] (2)在其他非离子表面活性剂溶液中的分子大小分布

[0264] 检查SPAPP是否在其他非离子表面活性剂溶液中形成高分子量聚集体。将分别为1%的PEG60十二烷基醚(Polypure)、曲拉通X-100和诺乃P-40用作表面活性剂。与实施例2的方法的情况一样,使用每种表面活性剂制备SPAPP悬浮液,并在采用离心和旋转式分子量截

留过滤器进行大小分级后,加入10%的SDS并与每个级分混合至溶解的聚集体终浓度为1%。通过BCA测定来测量所述级分的肽浓度,并且SPAPP聚集体的分子量分布总结如图6A和6B所示。柱状图A显示了在SPAPP悬浮于纯水中后迅速混合表面活性剂的情况,而柱状图B显示了在SPAPP悬浮于纯水中并在室温下静置90分钟后加入表面活性剂的情况。在柱状图中,“Ppt”表示通过离心除去,即,认为大小是1 μ m以上并且分子量为几百(千道尔顿)以上的沉淀。“>100kDa”表示100kDa以上,以及“<100kDa”表示100kDa以下。尽管大小分布根据表面活性剂的类型略有变化,但发现在上述条件下用任意的表面活性剂都可形成高分子量聚集体。

[0265] (3) 讨论

[0266] 从以上(1)和(2)发现分子大小(分子量/粒径)可以通过表面活性剂的类型和在纯水中的悬浮时间来控制。

[0267] [实施例4]

[0268] 本发明的使用抗原的抗体获得(2),单克隆抗体

[0269] 由于从实施例1发现针对SPAPP的抗体可以用不与载体蛋白结合的方法而获得,所以尝试生产单克隆抗体。

[0270] (1) 免疫

[0271] 通过实施例1(1)的方法制备抗原来免疫三十(30)只Balb/c小鼠。每隔两周进行免疫,总计七次。等量的Titer Max Gold(Titer Max有限公司)用作佐剂,并通过每次注射相当于20 μ g抗原至足垫中来进行免疫。免疫开始后的77天和90天的血清测试如下。

[0272] (2) 通过酶免疫测定(EIA)的抗体滴定度测量

[0273] (2-1) EIA试验方法

[0274] (2-1-1) 流程

[0275] (i) 将由比较例(4)的方法制造的SPAPP/OVA结合物用PBS稀释至2.5 μ g/ml,以100 μ l的体积加入至Nunc467120号Medisorp的孔中,并在4 $^{\circ}$ C下静置过夜。

[0276] (ii) 将孔中的溶液抽吸并排出,加入230 μ l的1%BSA/PBST并在室温下静置一小时以封闭。抽吸和排出封闭溶液后,加入230 μ l的1%BSA/PBS溶液并在室温下静置一小时以上,然后将孔中的溶液抽吸并排出。

[0277] (iii) 在每个孔中加入用1%BSA/PBS稀释的血清(100 μ l/孔)并在室温下静置一小时。

[0278] (iv) 将孔中的溶液抽吸并排出,用300 μ l的PBST(0.1%吐温20)将所述孔洗涤六次。

[0279] (v) 将用1%BSA/PBST稀释4,000倍的POD标记的抗小鼠IgG(MBL330号)作为第二抗体加入至孔中(100 μ l/孔)并在室温下静置一小时。

[0280] (vi) 将孔中的溶液抽吸并排出,用300 μ l的PBST(0.1%吐温20)将所述孔洗涤六次。

[0281] (vii) 将一百(100) μ l的TMB(DAKO S1599号)加入至孔中作为显色底物,并在室温下反应30分钟,加入等量的2N的硫酸终止反应。测量反应溶液在450nm处的吸光度。

[0282] (2-2-2) 结果

[0283] 图7描述了在77天和90天的稀释10,000倍的血清滴定度。尽管存在强度差,但发现9至10只小鼠(相当于约30只小鼠的1/3)的血清具有一定程度的反应性(400mOD以上)。

[0284] (3) 免疫荧光染色

[0285] 对于以上(2)中具有较高滴定度的6、9和15号个体血清,通过使用人成神经细胞瘤SK-N-SH细胞来进行免疫荧光染色。

[0286] (3-1) 流程

[0287] 在涂覆有聚-D-赖氨酸的载玻片室(Becton Dickinson354632号)中将人成神经细胞瘤SK-N-SH细胞接种于MEM α 培养基中,并在37℃、5%CO₂的保温箱中培养。

[0288] 以下操作在冰上进行:

[0289] (i) 用PBS洗涤五分钟,两次;

[0290] (ii) 用甲醇在-20℃下进行固定和渗透处理五分钟;

[0291] (iii) 用PBS洗涤一次;

[0292] (iv) 用5%的山羊血清/PBS封闭一小时;

[0293] (v) 添加用5%的山羊血清/PBS稀释250倍的上述小鼠血清,并静置一小时;

[0294] (vi) 用PBS洗涤五分钟,三次;

[0295] (vii) 加入用5%山羊血清/PBS稀释1000倍的荧光标记的第二抗体(Alexa FluorR488山羊抗小鼠IgG,2mg/ml,Invitrogen A11001号)并静置一小时;

[0296] (viii) 用PBS洗涤五分钟,三次;

[0297] (ix) 加入褪色抑制剂(ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI, Invitrogen,P36935号)并施加盖玻片;以及

[0298] (x) 用LSM(ZWEISS META5000)拍照。

[0299] (3-2) 染色结果

[0300] 结果示于图8。在图8中,橙色表示基于抗体应答的染色,以及蓝色表示核的DAPI染色。

[0301] (4) 单克隆抗体的生产

[0302] 将6、10和15号小鼠的脾淋巴细胞用于细胞融合。小鼠骨髓瘤细胞P3U1细胞用于细胞融合的细胞系,从而用“Antibodies;A LABORATORY MANUAL,Ed Harlow&David Lane,Cold Spring Harbor Laboratory,1988”所述的标准PEG(PEG1500)法来制造杂交瘤,并选择15个产生抗SPAPP抗体的杂交瘤克隆的菌株。为了选择候选菌株,进行以上(2)所述的使用涂覆有SPAPP/OVA的板的EIA法。选择EIA中具有较高反应性的十三(13)个孔。收集每个孔中的杂交瘤,并用有限稀释法从各96孔板中选择单克隆,并在HAT培养基(Invitrogen# 11875RPM1培养基1640,1%丙酮酸盐,1%青霉素链霉素原种,1×HAT)中生长和培养。用PBS洗涤培养的细胞并将约 1×10^7 个细胞腹膜内给药到降植烷处理的Balb/c小鼠,用常规方法获得腹水。用常规方法,使用HiTrap proteinG柱(GE Healthcare)纯化来自每只小鼠腹水的IgG。获得总计十种类型的纯化IgG,并命名为抗SPAPP单克隆抗体CM61、CM101、CM102、CM103、CM152、CM154、CM156、CM157、CM158和CM159,并用于以下试验。

[0303] [实施例5]

[0304] 本发明单克隆抗体的分析

[0305] (1) 斑点印迹的检测灵敏度和识别序列的特异性

[0306] (1-1) 试验方法

[0307] 用试验例3的方法将实施例4(4)获得的抗SPAPP单克隆抗体CM61用于SPAPP的斑点印迹。斑点中SPAPP(用1%吐温20稀释)的渗入量示于图9,并且10 μ g/ml的CM61用作第一抗

体。为了参考,使用与SPAPP相同的量,对在两个位点具有不同氨基酸的小鼠SPAPP和与SPAPP氨基酸组成相同而序列打乱的scSPAPP进行斑点印迹。

[0308] (1-2) 结果

[0309] 可检测到约40pg的SPAPP。还识别到小鼠SPAPP (mSPAPP)。这表明抗体可以用于使用小鼠细胞或个体的实验。另一方面,即使在160ng的情况下,scSPAPP也几乎没有反应性。这表明所获得的抗体具有序列特异性识别结合性,并非简单地识别疏水性氨基酸簇。

[0310] (2) EIA

[0311] 对于实施例4 (4) 获得的几种抗SPAPP单克隆抗体,通过使用涂覆有SPAPP/OVA的板进行EIA。

[0312] (2-1) 试验方法

[0313] 按照实施例4在SPAPP浓度为每1ml10ng、4ng、12ng、37ng、111ng、333ng、1 μ g、3 μ g和9 μ g下对十种单克隆抗体进行试验。

[0314] (2-2) 结果

[0315] 结果示于图10中。该EIA中,发现在抗体反应性较高的情况下从约10ng/ml起就可以检测到反应性。实施例1至5的结果证实了用本发明的使用无结合物的疏水性肽的免疫方法获得具有实用亲和性以及序列特异性识别的结合性的多克隆和单克隆抗体。

[0316] [实施例6]

[0317] 本发明的抗体用于检测临床样品中的抗原 (SPAPP)。将人血浆用作临床样品。

[0318] (1) 材料和方法

[0319] (i) EIA板的制备

[0320] 将以1mg/ml溶解于1%吐温20的SPAPP用纯水稀释200倍,以100 μ l的体积加入至Nunc467120号Medisorp的孔中,并在4 $^{\circ}$ C下静置过夜。将孔中的溶液抽吸并排出,加入230 μ l 1%BSA/PBST并在室温下静置一小时以封闭。

[0321] (ii) 添加SPAPP的人血浆 (临床样品) 的制备

[0322] 用镊子除去大的不需要的沉淀之后,对人血浆 (Kohjin) 以20,000 \times g离心30分钟以使用上清。用10%BSA/1%吐温20/PBS将在1%吐温20中溶解的一 (1) mg/ml的SPAPP稀释至由图13的图表所示的终浓度乘以12所得的浓度。将十 (10) μ l稀释的SPAPP溶液加入至100 μ l人血浆中从而获得添加SPAPP的人血浆。

[0323] (iii) 抗体溶液的制备和抗原-抗体反应

[0324] 在实施例5使用的抗体中,具有高EIA活性的抗SPAPP单克隆抗体CM61用1%BSA/PBST稀释至120ng/ml,从而制备抗SPAPP单克隆抗体溶液。将抗体溶液加入至 (ii) 获得的添加有SPAPP的人血浆中 (终浓度:10ng/ml)。在室温下进行抗原-抗体反应一小时。

[0325] (iv) EIA

[0326] 将一百 (100) μ l反应溶液加入至 (i) 的EIA板的每个孔中并在室温下静置一小时。

[0327] (v) 将孔中的溶液抽吸并排出,用300 μ l的PBST (0.1%吐温20) 将所述孔洗涤六次。

[0328] (vi) 将用1%BSA/PBST稀释4000倍的一百 (100) μ l POD标记的抗小鼠1gG (MBL330号) 作为第二抗体加入至孔中并在室温下静置一小时。

[0329] (vii) 将孔中的溶液抽吸并排出,用300 μ l的PBST (0.1%吐温20) 将所述孔洗涤六次。

[0330] (viii) 将一百 (100) μl 的 TMB (DAKO S1599 号) 加入至孔中作为显色底物, 并在室温下反应 30 分钟, 加入等量的 2N 硫酸以终止反应。测量反应溶液在 450nm 处的吸光度

[0331] (2) 结果和讨论

[0332] 结果示于图 13 中。该测定中人血浆的终浓度为 83%。抗 SPAPP 单克隆抗体 CM61 的终浓度为 10ng/ml。在无 SPAPP 的血浆的情况下, CM61 抗体与 E1A 板 (涂覆有 SPAPP 的板) 的结合难以被人血浆抑制, 该测定中, 在 450nm 的吸光度下, 显色为 1,100mOD。随着加入至血浆的 SPAPP 浓度升高, CM61 抗体先与溶液中的 SPAPP 结合, 因此, 溶液中的 SPAPP 与板上的 SPAPP 竞争, CM61 抗体与板的结合被抑制。图表的纵轴表示抑制程度, 用吸光度表示。根据该结果, 证实至少 200pg/ml 的该抗原存在于人血浆中, 与不存在抗原的情况相比, 该抗原由于该 E1A 体系中的吸光度差而可检测。由于人血浆中的蛋白质浓度为 50 至 70mg/ml, 这意味着使用 CM61 抗体的测定体系即使在血浆中以总蛋白质的三亿分之一 (1/300,000,000) 浓度存在也可检出抗原 (SPAPP) 的存在。人们认为约 10,000 种类型的蛋白质存在于人血浆中, 包括仅以痕量存在的那些。结果表明即使 10,000 种不同类型的蛋白质一起存在, 该测定也可以从这些蛋白质中辨别并检测 SPAPP。

[0333] [实施例 7]

[0334] SPAPP 以外的疏水性肽的免疫

[0335] 检测由另一序列组成的疏水性肽是否能够与 SPAPP 的情况一样, 获得对用作无结合物的免疫的抗原的疏水性肽具有反应性的抗体。试验方法按照实施例 1 的方法。

[0336] (1) 疏水性肽的合成

[0337] 选择以下 (i) 和 (ii) 作为疏水性肽以制造纯度为 70 至 80% 的合成肽。

[0338] (i) 由大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 外膜蛋白 ompA 衍生的序列, FGGYQVNPYVGFEMGYDWLGRMPY (FCG24/SEQ ID NO:2); 和

[0339] (ii) 由人 CD133 衍生的序列, FLFCWILMILVVLTFVVGANVEK (FLF23/SEQ ID NO:3)。

[0340] (2) 抗原的制备

[0341] 将 (1) 的疏水性肽加入至 1% 吐温 20 以制备悬浮液。通过动态光散射粒度分析仪 (N1KK1S0 Nanotracs UPA-UT151) 或 Countess 来确定各悬浮液中大颗粒的疏水性肽的存在。

[0342] 尽管由于仅 1% 吐温 20 溶液的信号与信号重叠, 不能通过动态光散射粒度分析仪确定 FCG24 悬浮液中的颗粒 (图 11B), 但可以通过 Countess (注册商标) 确定细胞大小的颗粒 (5 至 35 μm) (图 11A)。

[0343] 在 FLF23 悬浮液中, 确认到比仅 1% 吐温 20 溶液的信号大的尺寸的颗粒 (图 11C)。

[0344] (3) 免疫

[0345] 以上 (2) 获得的二 (2) mg/ml 的各悬浮液用于免疫 10 只小鼠, 并且在 60 天后收集血清 (#1 至 #10)。

[0346] (4) E1A

[0347] 通过使用涂覆有以上肽 (i) 或 (ii) (各 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的板进行 E1A。

[0348] (5) 结果

[0349] 结果示于图 12。

[0350] 与未免疫的小鼠血清 (图 12 中 “non-imm”) 相比, FCG24 和 FLF23 分别在 100 倍稀释的血清和 500 倍稀释的血清中具有高反应性。

[0351] 从这些结果,发现通过使用本发明制备抗原的方法,可以不使用结合物而获得针对其他疏水性肽的抗疏水性肽抗体。

[0352] 产业上的可利用性

[0353] 由于本发明能够获得针对疏水性肽的抗体,可以获得先前未得到的疏水性信号肽和膜蛋白质在生理功能如代谢途径、亚细胞定位和相互作用伴侣方面的新的有用信息。用这种方式获得的有用信息极有可能有助于对细胞功能的理解以及诊断剂和药剂的研发。尽管以常规方式获得针对膜蛋白质的抗体十分困难,但本发明将有效和显著地减少工作量和成本。

序列表

<110> 东亚合成株式会社
精工爱普生株式会社

<120> 用于获得抗疏水性肽抗体的抗原的制备方法

<130> TOA-1

<150> JP2011-002394

<151> 2011-1-7

<160> 3

<170> PatentIn 版本 3.1

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<220>

[0001]

<223> 肽

<400> 1

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg

1 5 10 15

Ala

<210> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<220>

<223> 肽

<400> 2

Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Val Gly Phe Glu Met Gly Tyr

1 5 10 15

Asp Trp Leu Gly Arg Met Pro Tyr

20

<210> 3

<211> 23

<212> PRT

<213> 人

<220>

[0002] <223> 肽

<400> 3

Phe Leu Phe Cys Trp Ile Leu Met Ile Leu Val Val Leu Thr Phe Val

1

5

10

15

Val Gly Ala Asn Val Glu Lys

20

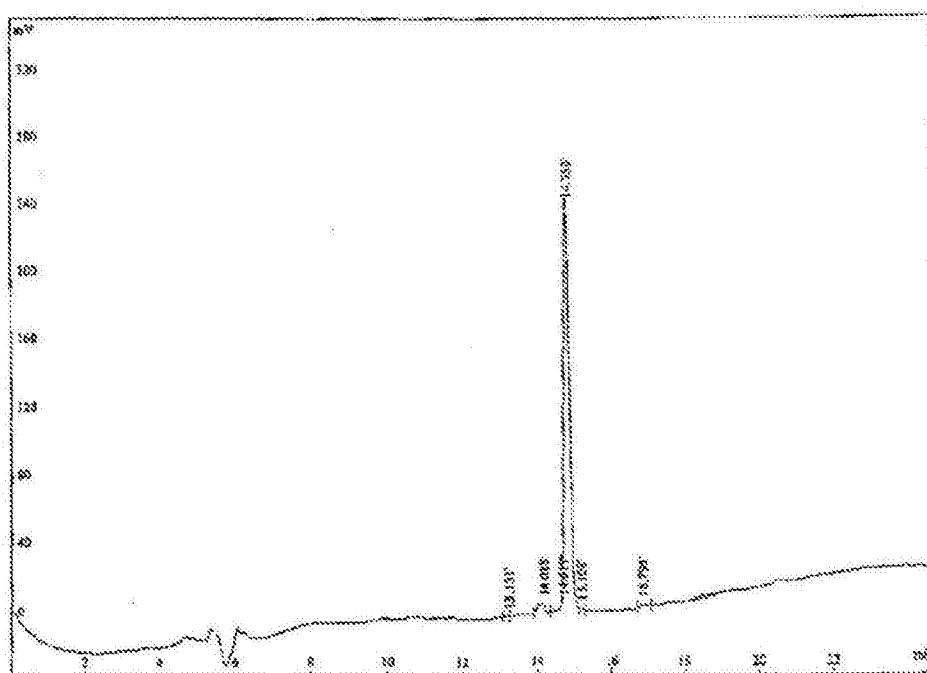
柱：4.6mm * 250mm, Hypersil 300A C18
 溶剂 A：在 100% 乙腈中的 0.1% 三氟乙酸
 溶剂 B：在 100% 水中的 0.1% 三氟乙酸

| 梯度： | A | B |
|---------|------|-----|
| 0.01 分钟 | 32% | 68% |
| 25.0 分钟 | 62% | 38% |
| 25.1 分钟 | 100% | 0% |
| 30.0 分钟 | | 终止 |

流速：1.0 ml/min

波长：220nm

体积：5ul



| 排列 | 时间 | 浓度 | 面积 | 塔板号 |
|----|--------|--------|---------|--------|
| 1 | 13.151 | 0.1358 | 3494 | 98937 |
| 2 | 14.088 | 3.351 | 88246 | 24027 |
| 3 | 14.617 | 1.115 | 28686 | 193785 |
| 4 | 14.750 | 94.38 | 2428723 | 53772 |
| 5 | 15.108 | 0.3534 | 9094 | 229084 |
| 6 | 16.798 | 0.667 | 17166 | 44110 |

图1

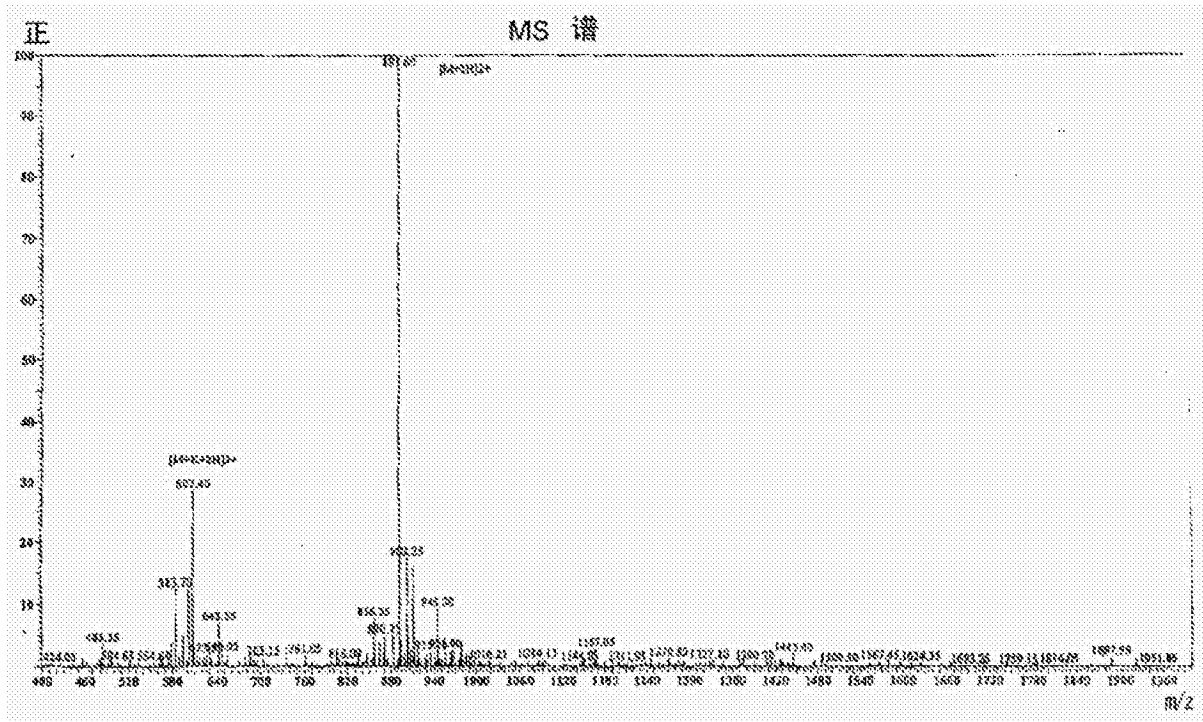


图2

小鼠个体号

| | | | | |
|----|----|----|----|----|
| 41 | 42 | 43 | 44 | 45 |
| 46 | 47 | 48 | 49 | 50 |
| 51 | 52 | 53 | 54 | 55 |
| 56 | 57 | 58 | 59 | 60 |

对应于个体号的血清 (500 倍稀释) 的斑点印迹
(左侧: 10ng, 右侧: 100ng)

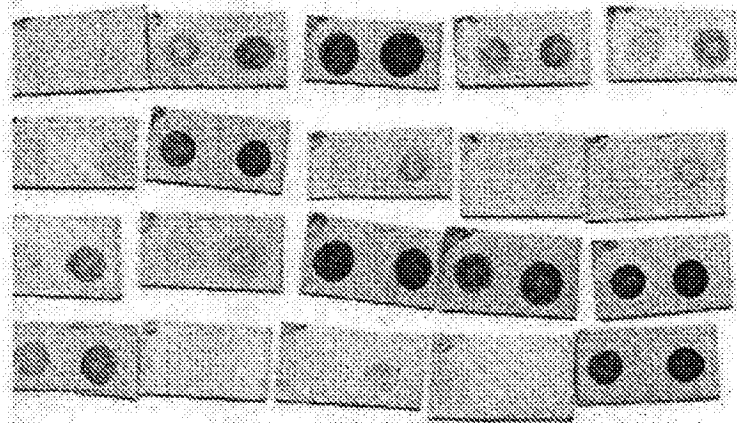


图3

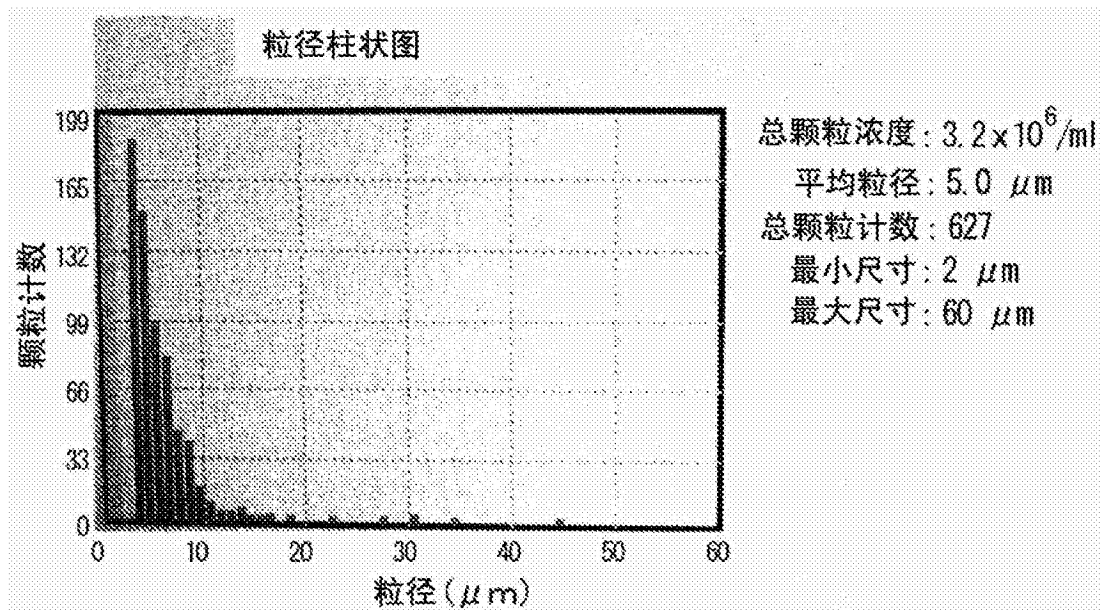


图4

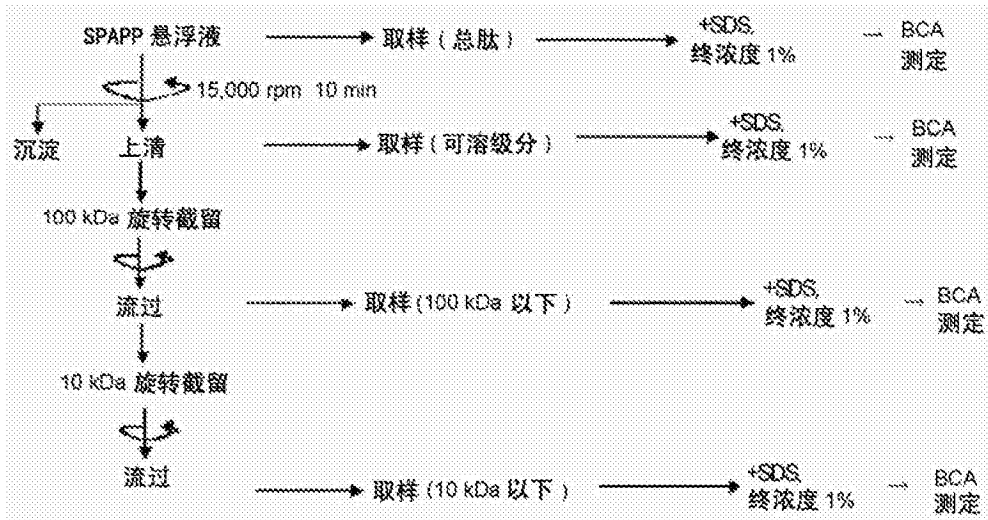


图5

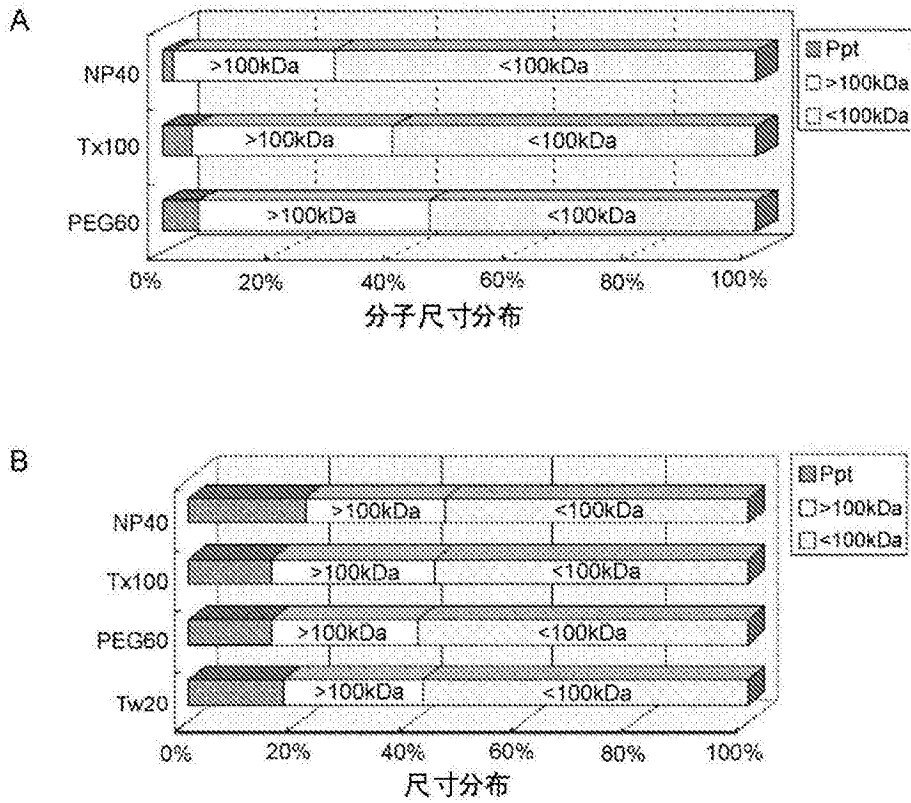


图6

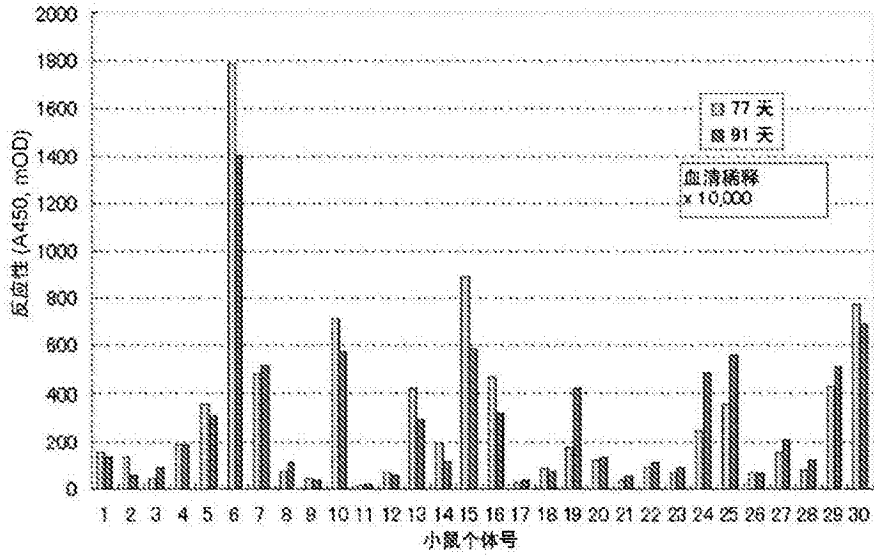


图7

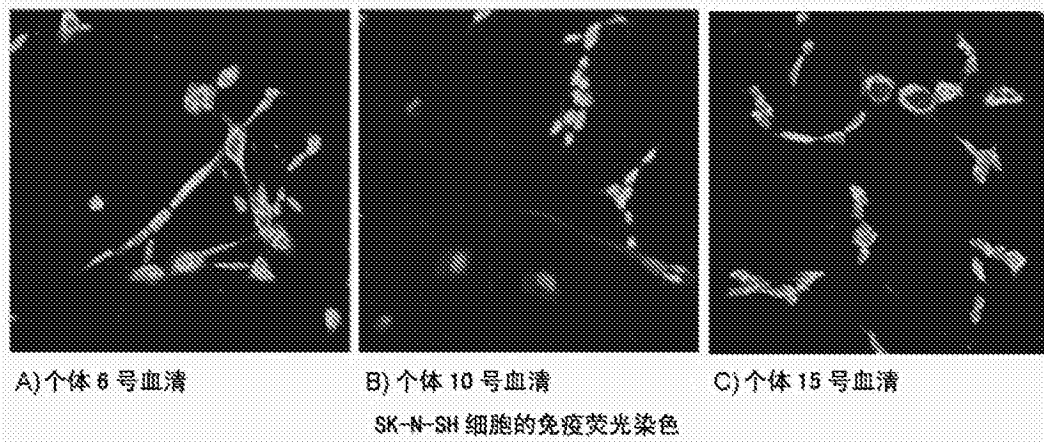


图8

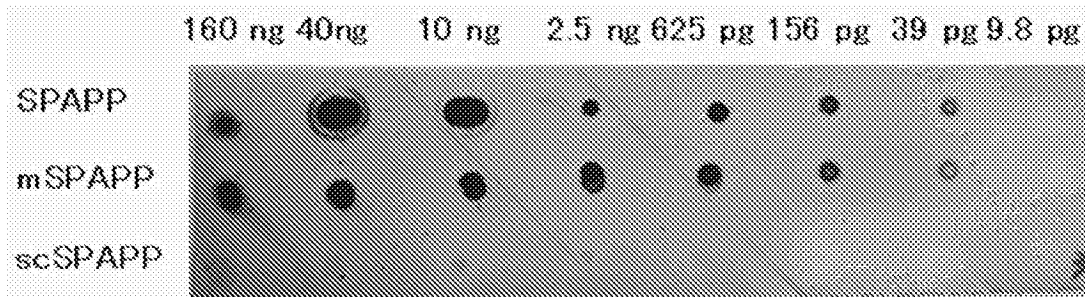


图9

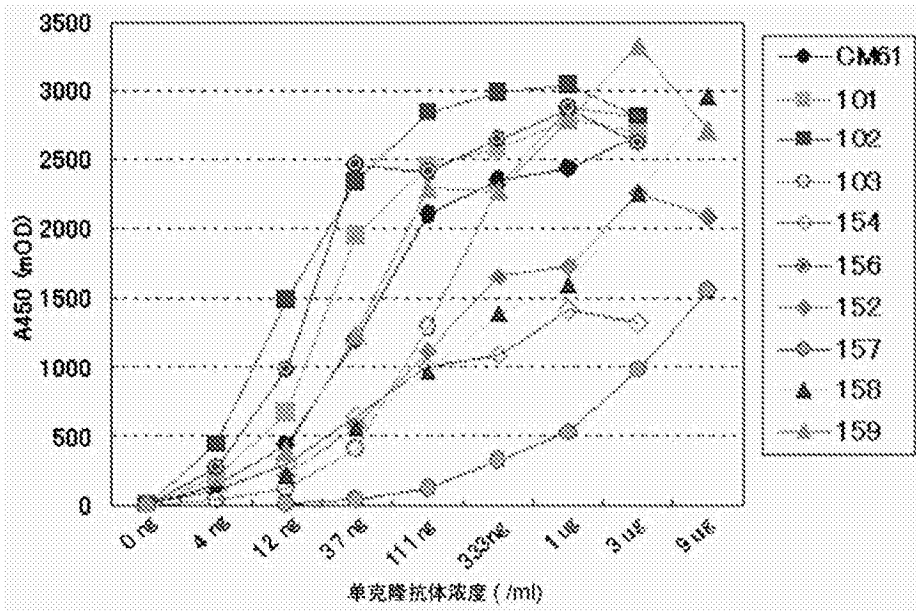


图10

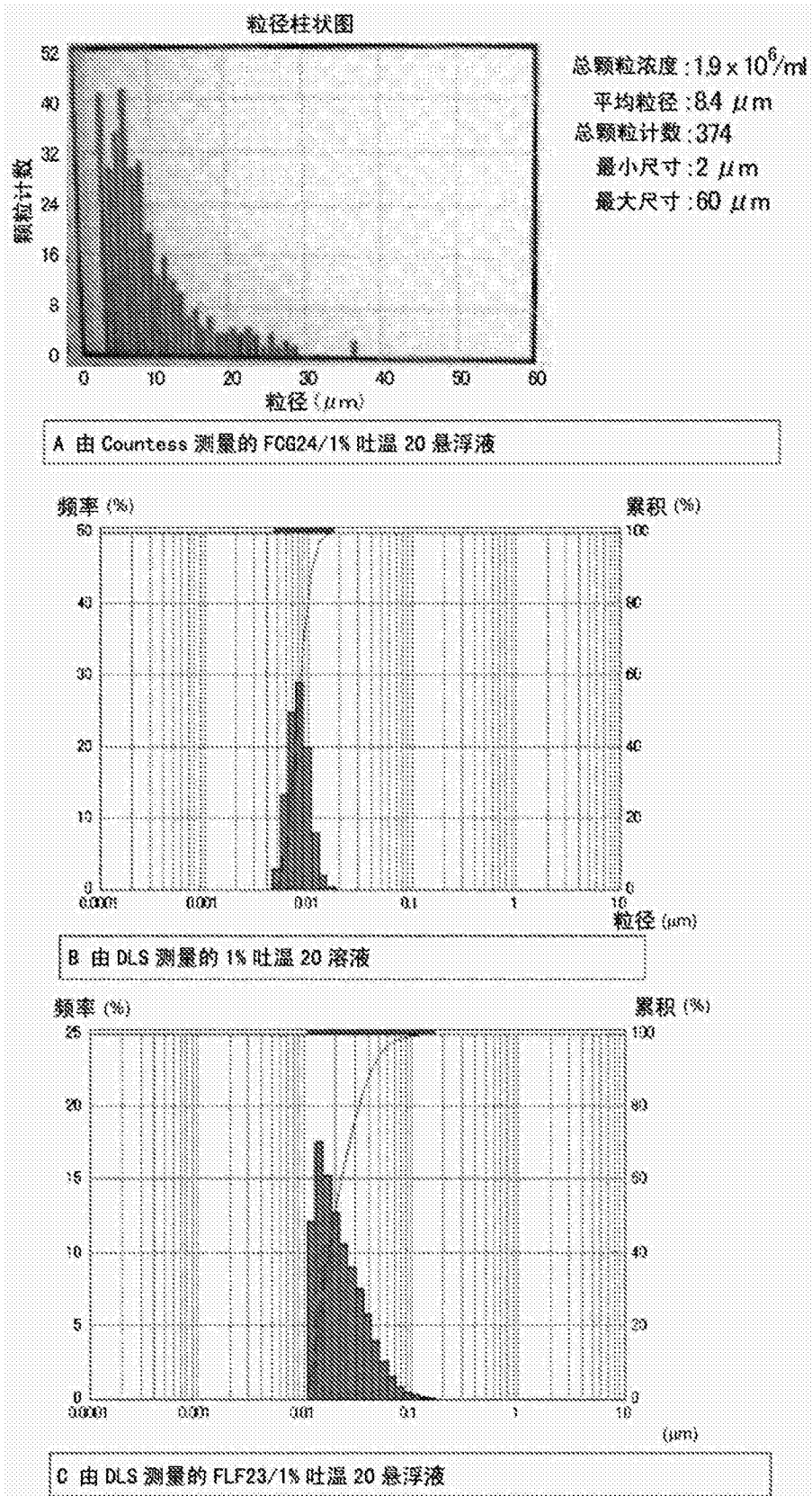


图11

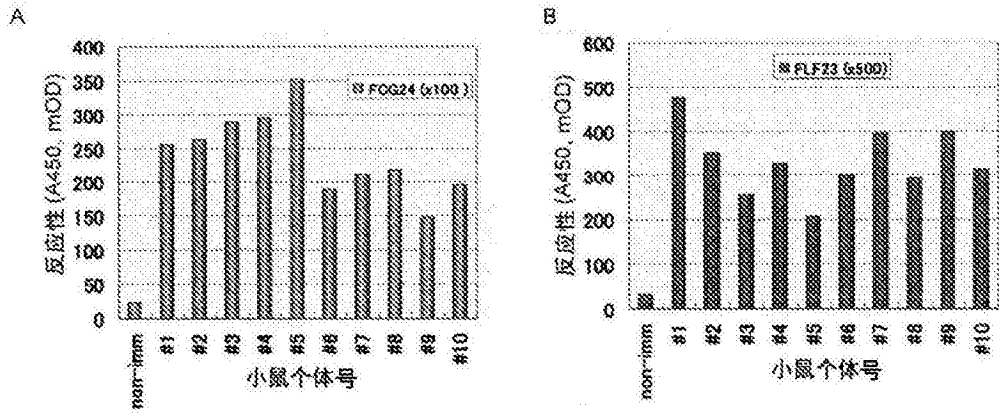


图12

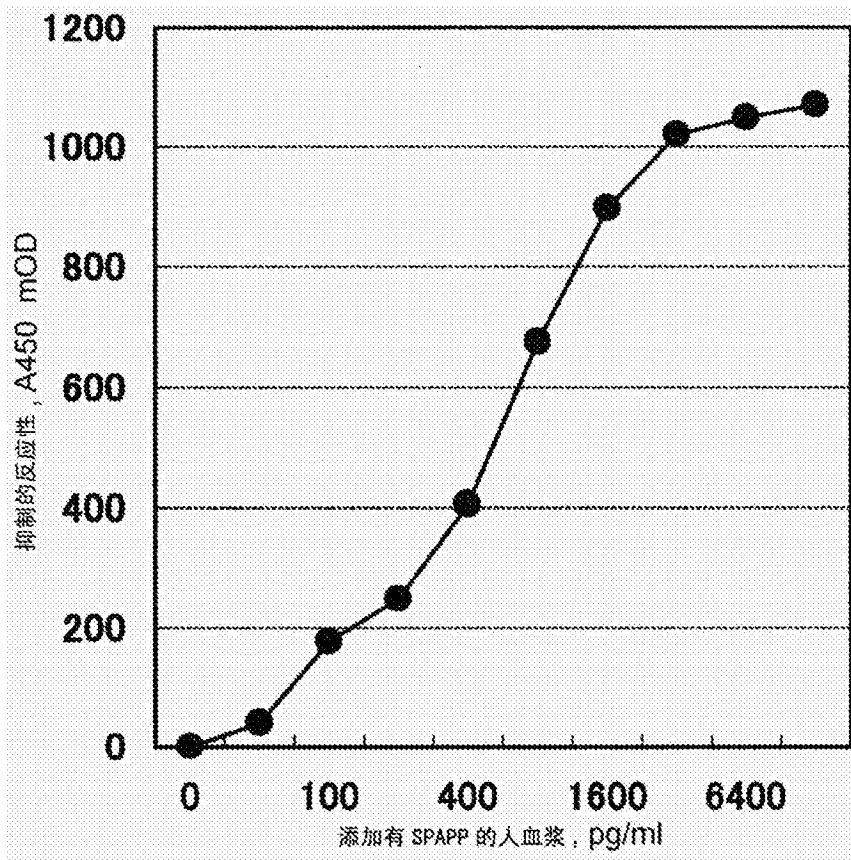


图13

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于获得抗疏水性肽抗体的抗原的制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN103298836B | 公开(公告)日 | 2017-03-08 |
| 申请号 | CN201280004805.2 | 申请日 | 2012-01-06 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 东亚合成株式会社 精工爱普生株式会社 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 东亚合成株式会社 精工爱普生株式会社 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 东亚合成株式会社 精工爱普生株式会社 | | |
| [标]发明人 | 冈本雅次 花村雅人 福岛均 吉田彻彦 | | |
| 发明人 | 冈本雅次 花村雅人 福岛均 吉田彻彦 | | |
| IPC分类号 | C07K16/28 C07K17/02 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | G01N33/6896 C07K14/245 C07K14/4711 C07K14/70596 C07K16/1232 C07K16/18 C07K16/2896 | | |
| 代理人(译) | 刘新宇 | | |
| 审查员(译) | 苗荻 | | |
| 优先权 | 2011002394 2011-01-07 JP | | |
| 其他公开文献 | CN103298836A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明的目的在于提供一种方法以获得针对疏水性肽的抗体，该疏水性肽可以容易地用于多种用途并且可靠性高。该制备抗原的方法的特征在于，在含有非离子表面活性剂的水溶液中将未结合至载体蛋白的疏水性肽用作高分子量聚集体。

