



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103122031 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 29

(21) 申请号 201210322795. 9

C07K 7/08 (2006. 01)

(22) 申请日 2002. 04. 05

(30) 优先权数据

0101232-7 2001. 04. 05 SE

0103754-8 2001. 11. 09 SE

(62) 分案原申请数据

02808940. 5 2002. 04. 05

(71) 申请人 南方佛斯卡专利公司

地址 瑞典兰德市

申请人 赛达斯西奈医疗中心

(72) 发明人 扬·尼尔森 普里迪曼·K·沙赫

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

代理人 肖善强

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61K 39/00 (2006. 01)

A61P 9/10 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书30页 附图6页

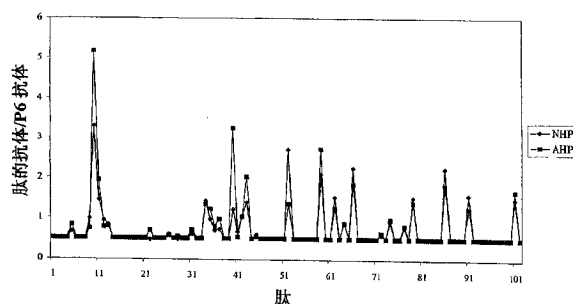
(54) 发明名称

以肽为基础的治疗动脉粥样硬化的免疫疗法

(57) 摘要

本发明涉及以肽为基础的治疗动脉粥样硬化的免疫疗法。本发明还涉及以肽为基础的用于确定针对氧化低密度脂蛋白的免疫反应的检测方法。本发明尤其涉及用于预防或治疗包括人类在内的哺乳动物中缺血性心血管疾病的载脂蛋白 B 的一个或多个片段的经纯化或重组产生的抗体, 以及含有这些抗体的药物制剂。

经 MDA 修饰的肽 201—302 的 IgG 抗体



1. 一种经纯化或重组产生的抗体,所述抗体为载脂蛋白 B 的片段的抗体,其中所述的片段是肽 KTTKQSFDSLVSVAQYKKNKH。
2. 如权利要求 1 所述的抗体,其中所述的抗体用于预防或治疗包括人类在内的哺乳动物中缺血性心血管疾病或动脉粥样硬化。
3. 如权利要求 1-2 中任一所述的抗体,其中所述的片段是经铜进行氧化过的。
4. 如权利要求 1-2 中任一所述的抗体,其中所述的片段是经丙二醛或羟基壬烯醛修饰过的。
5. 如权利要求 1-2 中任一所述的抗体,其中所述的片段结合于磷脂脂质体。
6. 用于预防或治疗包括人类在内的哺乳动物中缺血性心血管疾病或动脉粥样硬化的药物制剂,所述药物制剂含有治疗有效剂量的如权利要求 1-5 中任一所述的经纯化或重组产生的抗体。
7. 如权利要求 1-5 中任一所述的抗体在制备预防或治疗包括人类在内的哺乳动物中缺血性心血管疾病或动脉粥样硬化的药物组合物中的应用。
8. 用于对包括人类在内的哺乳动物中缺血性心血管疾病或动脉粥样硬化进行免疫或治疗的载脂蛋白 B 的片段,其中所述片段为肽 KTTKQSFDSLVSVAQYKKNKH。
9. 如权利要求 8 所述的片段,其中所述肽是经丙二醛或羟基壬烯醛修饰过的。
10. 如权利要求 8 所述的片段,其为天然形式或氧化形式。
11. 如权利要求 8 所述的片段,其中所述肽是经铜进行氧化过的。
12. 如权利要求 8 所述的片段,其中所述肽结合于磷脂脂质体。
13. 如权利要求 8-12 任一项所述片段在制备对缺血性心血管疾病或动脉粥样硬化进行免疫治疗或治疗的药物中的应用,所述片段可选地与佐剂联合使用。
14. 如权利要求 11 所述的应用,其中所述片段的免疫治疗剂量为 1-100mg。
15. 用于预防或治疗包括人类在内的哺乳动物中缺血性心血管疾病或动脉粥样硬化的药物制剂,其含有治疗剂量的如权利要求 8-12 任一项所述的片段,所述制剂还可选择性包含一种或多种药理上无害的填料和 / 或佐剂。
16. 如权利要求 15 所述的药物制剂,其中,所述片段连接于阳离子牛血清白蛋白,并使用氢氧化铝作为佐剂。
17. 如权利要求 15 所述的药物制剂,其为可注射的药物制剂。
18. 含有如权利要求 8-12 任一项所述的片段的疫苗。

以肽为基础的治疗动脉粥样硬化的免疫疗法

[0001] 本发明是中国申请号 :02808940. 5 (PCT/SE02/00679) 申请的分案申请 ;原申请的申请日为 2002 年 4 月 5 日,发明名称为 :以肽为基础的治疗动脉粥样硬化的免疫疗法,和以肽为基础的用于确定针对氧化低密度脂蛋白的免疫反应的检测方法。

技术领域

[0002] 本发明涉及新肽,特别涉及用于对动脉粥样硬化进行免疫治疗以及用于以肽为基础的 ELISA 检测中的肽,所述 ELISA 检测用于确定针对氧化低密度脂蛋白的免疫反应,以及诊断有无动脉粥样硬化的存在。

[0003] 特别地,本发明包括 :

[0004] 1) 表 1 中所列的任一种肽在免疫疗法或“抗动脉粥样硬化疫苗”中的应用,所述肽以天然或经 MDA 修饰的形式单独或联合使用,优选与适当的载体和佐剂同时使用,用于预防和治疗缺血性心血管疾病。

[0005] 2) 上述肽在 ELISA 中的应用,用于检测与缺血性心血管疾病发生危险性升高或降低有关的抗体。

技术背景

[0006] 动脉粥样硬化是一种引起大、中动脉的最内层(内膜)变厚的慢性疾病。该疾病使得血流速度减慢,可以导致由受影响的血管供血的器官发生缺血和组织损伤。动脉粥样硬化是心血管疾病发生的主要原因,包括心肌梗塞、中风、外周动脉疾病。该疾病是西方国家的主要死亡原因。预计在二十年内,该疾病将成为全世界的首要死因。

[0007] 该疾病是由脂蛋白在血管的细胞间质累积所引起的,主要是低密度脂蛋白(LDL)。这些 LDL 颗粒聚集在一起,并经过氧化修饰。氧化后的 LDL 具有毒性,导致血管损伤。在许多方面,动脉粥样硬化表现为对所述损伤的一种反应,包括炎症和纤维化。

[0008] 1989 年,Palinski 及其同事发现人类中存在着抗氧化 LDL 的循环自身抗体。该发现提示了动脉粥样硬化可能是一种由抗氧化脂蛋白的免疫反应所引起的自身免疫性疾病。在此期间,有多个实验室开始寻求抗氧化 LDL 的抗体滴度与心血管疾病之间的关系。然而,这些研究所提示的结果并不是很清楚。所存在的抗氧化 LDL 的大量不同抗原决定基的抗体,以及这些抗原决定基的结构并不清楚。因此,术语“氧化 LDL 抗体”是指尚不知晓的不同抗体的混合物,而不是某一个特定的抗体。T 细胞非依赖性 IgM 抗体比 T 细胞依赖性 IgM 抗体更加多一些。

[0009] 心血管疾病的患者以及健康对照人群中均存在着抗氧化 LDL 的抗体。尽管之前有一些研究报道抗氧化 LDL 的抗体滴度和心血管疾病之间存在着联系,但是其它研究并没有发现这样的关系。这些研究的一个重要缺陷在于,它们所采用的确定抗体滴度的 ELISA 方法中将氧化 LDL 颗粒作为配体。在不同的个体中,LDL 的构成不同,控制和评价氧化修饰的程度较为困难,也不能确定氧化 LDL 颗粒中针对不同抗原决定基的抗体水平。在一定程度上,由于技术问题,使用现有技术评价抗氧化 LDL 的抗体的作用是非常困难的。然而,如果

使用完整的氧化 LDL 颗粒,从而产生明确的并可以复制的疫苗组份也不是不可能的事情。

[0010] 研究针对血管壁上氧化 LDL 的自身免疫反应在动脉粥样硬化中所起的作用的另一种方法,是用自体氧化 LDL 免疫动物。该方法所基于的思想是,通过采用经典的免疫技术,如果抗氧化 LDL 的自身免疫反应得到了增强,那么,其将导致血管炎症加剧以及进行性的动脉粥样硬化。为了验证该假设,用同源氧化 LDL 免疫兔子,然后给所述动物喂食 3 个月的高胆固醇饮食从而诱导动脉粥样硬化。

[0011] 然而,与原有假设相反的是,用氧化 LDL 进行免疫具有保护性效应,使动脉粥样硬化减少了 50% 左右。在随后的实验中,我们给予动物高胆固醇饮食以及血管气球损伤从而导致更严重的斑块形成,但是,我们观察到了与上述类似的结果。与我们的研究相一致的是,其它多个实验室也报道了类似的观察结果。结合现有资料清楚地表明,存在有防止动脉粥样硬化形成和发展的免疫反应,这些反应中包括抗氧化 LDL 的自身免疫反应。

[0012] 上述观察结果同时还提示了在人类中有可能研究出治疗由动脉粥样硬化所引起的心血管疾病的免疫疗法或“疫苗”。其中一种方法就是将个体自身的 LDL 先暴露于例如铜等物质进行氧化,然后用该氧化了的自身 LDL 免疫所述个体。然而,该方法还存在这样一个问题,那就是目前仍然不知道是何种氧化 LDL 结构诱导了保护性的免疫反应,以及氧化 LDL 是否也含有抗原决定基,从而会引起不良的免疫反应。

[0013] 确定氧化 LDL 的抗原决定基是非常重要的,其原因如下:

[0014] 首先,一个或多个上述抗原决定基可能是激活抗动脉粥样硬化免疫反应的原因,在用氧化 LDL 免疫的动物中观察到了该免疫反应。因此,含有这些抗原决定基的肽意味着在人类中研究出免疫疗法或“动脉粥样硬化疫苗”的可能性。进一步地,这些肽可以用于治疗人类的动脉粥样硬化。

[0015] 其次,含有经确定的抗原决定基的肽可以用于 ELISA 方法中,所述 ELISA 方法能够检测出抗氧化 LDL 的特定结构的抗体。所述 ELISA 方法比现有的将氧化 LDL 颗粒作为抗原的 ELISA 方法更加准确和可靠。同时,该方法还可以对抗氧化 LDL 的不同抗原决定基的免疫反应进行分析,其中所述免疫反应与心血管疾病有关。

[0016] 美国专利 US5972890 涉及肽在诊断动脉粥样硬化中的应用。该美国专利所公开的技术主要是一种放射物理诊断方法。对一肽序列进行放射性标记,然后将其注入血流中。如果该肽序列与载脂蛋白 B 的序列一致,则该肽序列将结合到具有载脂蛋白 B 受体的组织上。在血管中,该序列将位于所有动脉粥样硬化斑块的上面。然后通过例如 γ 照相机等方法确定血管壁的放射性浓度。因此,该技术是一种放射物理诊断方法,其基于的原理是,放射性标记的肽序列结合于动脉粥样硬化斑块中正常组织的受体上,然后通过外部放射性分析的方法进行检测。该方法是一种确定动脉粥样硬化斑块的直接分析方法。在该方法中,病人需要注射放射性混合物。

[0017] 本发明的技术基于不同的原理和方法。与权利要求 11 相一致,本发明涉及用于免疫抗心血管疾病的载脂蛋白 B 的片段,以及一种诊断针对载脂蛋白 B 的肽序列的免疫反应的方法。在具有严重动脉粥样硬化的个体中显示,上述免疫反应得到了增强。本发明基于将肽序列附着于聚合物小孔的底部。当将血样加入小孔中时,所述肽将与这些序列的特异性抗体相结合,从而可以通过一种免疫方法/技术确定所结合的抗体的量。与上述美国专利的技术相比,本发明的技术并不是一种直接确定和定位动脉粥样硬化斑块的方法,而是

确定与动脉粥样硬化的程度和范围具有高度协同变异的免疫反应。

[0018] 因此,本发明的基本原理与上述专利申请完全不同,后者所依赖的基础为肽序列与发生动脉粥样硬化的组织中的正常脂蛋白受体相结合,而前者的基础在于发现了存在有针对肽序列的免疫反应,并确定抗这些肽序列的抗体。

[0019] 已经公开的研究 (Palinski 等,以及 George 等,1998) 表明,抗氧化 LDL 的免疫反应减少了动脉粥样硬化的发生。其提示了,抗氧化 LDL 的免疫反应总体上具有保护作用。然而令人惊奇的是,本文的研究结果表明,并不总是如上所述。例如,用肽 #10,45,154,199,240 的混合物进行免疫会增加动脉粥样硬化的发生。用其他肽序列进行免疫,例如肽序列 #1,30-34,对动脉粥样硬化的发生总体上没有什么效应。上述结果令人非常吃惊,因为其为以下事实提供了依据,即根据所针对的氧化 LDL 的结构,所述抗氧化 LDL 的免疫反应可以防止、促进动脉粥样硬化的发生、或者没有任何效应。这些发现使研究出单独激活保护性免疫反应的免疫方法成为可能。进一步地,这些发现表明,当使用完整的氧化 LDL 进行免疫时,如果所使用的颗粒含有大量的引起动脉粥样硬化免疫反应的结构时,可能会产生不良效果。

[0020] W09908109 涉及一组单克隆鼠抗体的应用,其中所述抗体结合氧化 LDL 颗粒,从而确定血清和血浆中是否存在氧化 LDL。其与本发明中所公开的确定抗氧化 LDL 抗体的方法完全不同。

[0021] 美国专利 US4970144 涉及一种通过肽序列进行免疫从而制备抗体的方法,其中所述抗体可以通过 ELISA 方法确定载脂蛋白。因此,该申请也与本发明不同。

[0022] 美国专利 US5861276 中描述了一种针对正常状态的载脂蛋白 B 的重组抗体。该抗体用于确定血清和血浆中是否存在正常的载脂蛋白 B,并通过降低循环中正常 LDL 颗粒的量从而治疗动脉粥样硬化。

[0023] 因此,本发明描述了抗体在治疗动脉粥样硬化中的应用。然而,与美国专利 US5861276 相比,这些抗体针对的是氧化 LDL 颗粒的结构,而不是正常 LDL 颗粒的结构。其优点是,氧化 LDL 被认为可以导致动脉粥样硬化的发生。在上述美国申请中没有描述抗氧化 LDL 特定结构的抗体的应用。

[0024] 本发明的简要概述

[0025] 目前认为,动脉血管壁上的载脂蛋白发生氧化,主要是 LDL,是动脉粥样硬化发生的一个重要因素。LDL 氧化过程中的产物对血管细胞具有毒性,导致炎症以及斑块的形成。免疫系统识别氧化 LDL 的抗原决定基,并产生抗体。动物实验表明,上述免疫反应中有一些是起保护作用的,防止动脉粥样硬化的发生和发展。抗体几乎专门针对以肽为基础的结构。通过采用含有 LDL 中唯一存在的蛋白质 - 载脂蛋白 B 的完整序列的多肽库,确定了氧化 LDL 中导致人类产生抗体的抗原决定基。这些肽 - 抗原决定基可以用于 ELISA 方法中,研究抗氧化 LDL 的免疫反应与心血管疾病之间的关系,以及研究出预防和治疗缺血性心血管疾病的免疫疗法或抗动脉粥样硬化的“疫苗”。

[0026] 本发明的详细描述

[0027] 对氧化 LDL 的抗原决定基的分子特征进行了研究,所述抗原决定基在人类中导致依赖抗体的免疫反应。所使用的方法利用了这样一个事实,也就是,免疫反应几乎总是专门针对具有 5 到 6 个氨基酸长度的肽序列。LDL 只含有一个蛋白质,即具有 4563 个氨基酸长度的载脂蛋白 B。在氧化过程中,载脂蛋白 B 发生分裂,醛加合物连接至带有正电荷的氨基

酸上,特别是赖氨酸。这就意味着,免疫细胞能够接近在正常情况下由于载脂蛋白的 B 三维结构而不暴露于免疫系统的肽序列,和 / 或正常状态下暴露的肽序列结合了醛使其半抗原化,从而具备了免疫原性。

[0028] 因此,下列肽,不论天然形式或为 MDA 衍生物,应具备足够的量从而产生免疫反应,这些肽是:

[0029] FLDTVYGNCSHTFTVKTRKG
[0030] PQCSTHILQWLKRVHANPLL
[0031] VISIPRLQAEARSEILAHWS
[0032] KLVKEALKESQLPTVMDFRK
[0033] LKFVTQAEGAKQTEATMTFK
[0034] DGSLRHKFLDSNIKFSHVEK
[0035] KGTYGLSCQRPNTGRLNGE
[0036] RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ
[0037] SLTSTSDLQSGIIKNTASLK
[0038] TASLKYENYELTLKSDTNGK
[0039] DMTFSKQNALLRSEYQADYE
[0040] MKVKIIRTIDQMENSELQWP
[0041] IALDDAKINFNEKLSQLQTY
[0042] KTTKQSFDSL SVKAQYKKNKH
[0043] EEEMLENSLVCPKDATTRFK
[0044] GSTSHHLVSRKSISAALCHK
[0045] IENIDFNKSGSSTASWIQNV
[0046] IREVTQRLNGEIQALELPQK
[0047] EVDVLT KYSPEDSLIPFFE
[0048] HTFLIYITELLKKLQSTTVM
[0049] LLDIANYLMEQIQDDCTGDE
[0050] CTGDEDYTYKIKRVIGNMGQ
[0051] GNMGTMEQLTPELKSSILK
[0052] SSILKCVQSTKPSLMIQKAA
[0053] IQKAAIQALRKMEPKDKDQE
[0054] RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ
[0055] SLNSHGLELNADILGTDKIN
[0056] WIQNVDTKYQIRIQIQEKLQ
[0057] TYISDWWTLAAKNLTDFAEQ
[0058] EATLQRIYSLWEHSTKNHLQ
[0059] ALLVPETEEAKQVLFLDTV
[0060] IEIGLEGKGFEPTEALFGK
[0061] SGASMKLTTNGRFREHNAKF
[0062] NLIGDFEVAEKINAFRAKVH

[0063] GHSVLTAKGMALFGEKAEF

[0064] FKSSVITLNTNAELFNQSDI

[0065] FPDLGQEVALNANTKNQKIR, 以及不产生抗体的肽

[0066] ATRFKHLRKYTYNYQAQSSS

[0067] 或上述一个或多个肽的一个活性位点。

[0068] 材料与方法

[0069] 为了确定由于 LDL 氧化而导致载脂蛋白 B 的哪一部分具备了免疫原性, 我们制备了包含人类载脂蛋白 B 的完整序列的多肽库, 每个肽具有 20 个氨基酸长度。在断裂点处, 用一个具有 5 个氨基酸长度的重叠序列制备所述肽, 从而覆盖了所有序列。可以采用天然形态的肽, 或将肽结合于磷脂脂质体之后, 或将肽在暴露于铜进行氧化之后, 或用丙二醛 (MDA) 进行修饰之后, 使用所得到的肽。上述经铜氧化或 MDA 修饰是模拟在 LDL 氧化过程中可能发生的不同形式的氨基酸修饰。

[0070] 肽

[0071] 相应于人类载脂蛋白 B 的全部氨基酸序列, 合成了 302 个肽。(Euro-Diagnostica AB, Malmö, 瑞典, 以及 Kj Ross Petersen AS, Hørsholm, 丹麦), 并将它们用于 ELISA 检测中。在 37°C 下, 用 0.5M MDA (Sigma-Aldrich Sweden AB, 斯德哥尔摩, 瑞典) 处理所述经合成的肽 3 小时, 从而对每个经合成的肽的一部分进行修饰, 或在 37°C 下, 用 5 μ M CuCl₂ (Sigma) 处理 18 小时。在 4°C 下, 用含有 1mMEDTA 的 PBS 溶液对经 MDA 修饰的肽进行透析 18 小时, 中间更换 PBS 溶液数次。在适于分离肽的变性聚丙烯酰胺凝胶 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 上检测经修饰的肽。在蛋白质的 N 末端起对肽进行编号, 为 1 至 302。

[0072] 在制备衍生物的过程中也可以使用其它的醛类, 例如, 羟基壬烯醛及其它。

[0073] 脂质体

[0074] 将摩尔比为 9 : 1 的卵磷脂 (EPC) (Sigma) 和磷脂酰丝氨酸 (PS) (Sigma) 的氯仿溶液, 与浓度为 3mM 的磷脂 (PL) 溶液进行混合, 并在玻璃容器中用缓慢的氩气流进行吹干。然后, 将容器放在真空状态下 3 小时。取 5ml 含有 0.1mM 肽、经无菌过滤的 PH 为 7.4 的 10mM HEPES 缓冲液、45mM NaCl、0.003% 叠氮钠的溶液加入 EPC/PS 干燥层中, 并在 50°C 下孵化 15 分钟。在室温下, 轻微振荡所述混合物, 然后将其放于冰水中, 用振幅为 7.5 微米的微波进行超声降解 3×3 分钟 (Sonyprep 150MSE Sanyo, Tamro-medlab, 瑞典), 每次间隔 1 分钟。将所述 PL-肽混合物贮存于玻璃小瓶中, 并位于氩气下面, 瓶的外周用铝箔包裹, 在 4°C 下贮存, 并在 1 周内使用。所述 PL-肽混合物是天然形式, 或是用 0.5M MDA 在 37°C 下进行处理 3 小时, 或是用 5 μ M CuCl₂ 在 37°C 下处理了 18 小时。在贮存前, 所述经 MDA 修饰的混合物需要在 4°C 下用含有 1mM EDTA 的 PBS 溶液对其进行透析 18 小时, 中间需要更换 PBS 溶液数次。在适于分离肽的变性聚丙烯酰胺凝胶 (Bio-Rad Laboratories AR, Sundbyberg, 瑞典) 上检测所述经修饰的混合物。

[0075] 血浆样品

[0076] 从 10 名心血管疾病 (AHP) 的患者中采集血浆样品, 并从正常血液供体 (NHP) 中收集 50 份血浆样品, 其中 25 名为男性, 25 名为女性。将收集到的两种血浆样品池进行分装, 并在 -80°C 保存。

[0077] ELISA

[0078] 不论有无脂质体,用 PH7.4 (20 μ g/ml) 的 PBS 溶液稀释天然或经修饰的合成肽,然后加入微孔滴定板的小孔中 (Nunc Maxisorp, Nunc, Roskilde, 丹麦),在 4℃ 下孵化过夜。作为参考,在每块板上都加入其中一种肽 (P6)。用含有 0.05% Tween-20 的 PBS 溶液清洗滴定板,然后在室温下,用含有 Superblock 的 TBS 溶液 (Pierce, Rockfor, IL) 封闭所述经包被的板 5 分钟,随后孵化人类血浆样品,用含有 0.05% Tween-20 的 TBS (TBS-T) 以 1 : 100 的比例稀释所收集到的人血浆样品,AHP 或 NHP 血浆,并将其加入反应板中,在室温下孵化 2 小时,然后在 4℃ 下孵化过夜。洗板后,用生物素标记的兔抗鼠 Ig 抗体 (Dako A/S, Glostrup, 丹麦) 检测沉积的抗所述肽的抗体,所述兔抗鼠抗体用 TBS-T 溶液进行适当地稀释,在室温下,继续孵化 2 小时;然后,洗板,用碱性磷酸酶结合的抗生蛋白链菌素 (Sigma) 检测结合的生物素标记的抗体,在室温下孵化 2 小时。用磷酸酶底物试剂盒 (Pierce) 进行显色反应,在室温下孵化 1 小时后,在 405nm 处测量吸光度。将不同肽的吸光度值除以 P6 的吸光度值,进行比较。

[0079] 由人类血浆中的抗体所识别的脂蛋白 B 序列参见后面序列表中序列号 1-37 的序列。AHP 和 NHP 中均含有针对大量不同肽的抗体。我们确定了抗天然形式和经修饰的肽的抗体。总体来说,抗 MDA 修饰的肽的抗体滴度高于或等于抗天然肽的抗体的滴度。比较天然肽,经 MDA 修饰的肽、以及被铜氧化的肽,显示它们之间具有高度的相关性,在经 MDA 修饰的肽中检测到了滴度最高的抗体。使用结合于脂质体的肽并没有导致抗体水平的升高。IgM 亚型的抗体多于 IgG 型的抗体。

[0080] 针对所检测到的具有最高抗体水平的肽可以分为六组,这六组之间具有共同的特征 (表 1)

[0081] (A) 高水平的抗经 MDA 修饰的肽的 IgG 抗体 ($n = 3$);

[0082] (B) 高水平的 IgM 抗体,但是在天然和经 MDA 修饰的肽之间没有差异 ($n = 9$);

[0083] (C) 高水平的 IgG 抗体,但是在天然和经 MDA 修饰的肽之间没有差异 ($n = 2$);

[0084] (D) 高水平的抗经 MDA 修饰的肽的 IgG 抗体,在 NHP 样品池中的抗体水平至少是 AHP 样品池中抗体的两倍 ($n = 5$);

[0085] (E) 高水平的抗经 MDA 修饰的肽的 IgM 抗体,在 NHP 样品池中的抗体水平至少是 AHP 样品池中抗体的两倍 ($n = 11$);

[0086] (F) 高水平的 IgG 抗体,但是在完整的和经 MDA 修饰的肽之间没有差异,在 AHP 样品池中的抗体水平至少是 NHP 样品池中抗体的两倍 ($n = 7$);

[0087] (G) 没有 IgG 或 IgM 抗体。

[0088] 表 1

[0089] A. 高 IgG,有 MDA 差异

[0090] P11. FLDTVYGNCSTHFTVKTRKG

[0091] P25. PQCSTHILQWLKRVHANPLL

[0092] P74. VISIPRLQAEARSEILAHWS

[0093] B. 高 IgM,没有 MDA 差异

[0094] P40. KLVKEALKESQLPTVMDFRK

[0095] P68. LKFVTQAEGAKQTEATMTFK

[0096] P94. DGSLRHKFLDSNIKFSHVEK

- [0097] P99. KGTYGLSCQRDPNTGRLNGE
[0098] P100. RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ
[0099] P102. SLTSTSDLQSGIIKNTASLK
[0100] P103. TASLKYENYELTLKSDTNGK
[0101] P105. DMTFSKQNALLRSEYQADYE
[0102] P177. MKVKIIRTIDQMQNSELQWP
[0103] C. 高 IgG, 没有 MDA 差异
[0104] P143. IALDDAKINFNEKLSQLQTY
[0105] P210. KTTKQSFDSLVSQAQYKKNKH
[0106] D. NHS/AHP, IgG-ak > 2, 有 MDA 差异
[0107] P1. EEEMLENVSLVCPKDTRFK
[0108] P129. GSTSHHLVSRKSISAALEHK
[0109] P148. IENIDFNKSGSSTASWIQNV
[0110] P162. IREVTQRLNGEIQALELPQK
[0111] P252. EVDVLTKYSQPEDSLIPFFE
[0112] E. NHS/AHP, IgM-ak > 2, 有 MDA 差异
[0113] P301. HTFLIYITELLKKLQSTTVM
[0114] P30. LLDIANYLMEQIQDDCTGDE
[0115] P31. CTGDEDYTYKIKRVIGNMGQ
[0116] P32. GNMGTMEQLTPELKSSILK
[0117] P33. SSILKCVQSTKPSLMIQKAA
[0118] P34. IQKAAIQALRKMEPKDKDQE
[0119] P100. RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ
[0120] P107. SLNSHGLELNADILGTDKIN
[0121] P149. WIQNVDTKYQIRIQIQEKLQ
[0122] P169. TYISDWWTLAAKNLTDFAEQ
[0123] P236. EATLQRIYSLWEHSTKNHLQ
[0124] F. NHS/AHP, IgG-ak < 0.5, 没有 MDA 差异
[0125] P10. ALLVPPETEEAKQVFLDVT
[0126] P45. IEIGLEGKGFEPTEALFGK
[0127] P111. SGASMKLTTNGRFREHNAKF
[0128] P154. NLIGDFEVAEKINAFRAKVH
[0129] P199. GHSVLTAKGMALFGGKAEF
[0130] P222. FKSSVITLNTNAELFNQSDI
[0131] P240. FPDLGQEVALNANTKNQKIR
[0132] G.
[0133] P2. ATRFKHLRKYTYNYQAQSSS

[0134] 所有上述的 38 个肽序列均代表了免疫反应的靶目标, 所述免疫反应在动脉粥样硬化和缺血性心血管疾病的发生中可能起着重要的作用。因此, 这些肽可以用于 ELISA 检

测中,以确定抗体水平与发生心血管疾病的危险之间的关系,其中所述抗体针对载脂蛋白 B 中经 MDA 修饰的确定的氨基酸序列。

[0135] 同时,这些肽还代表了保护性免疫反应中的可能介质,所述保护性免疫反应是在用氧化 LDL 对实验动物进行免疫时观察到的。而且,在研究抗动脉粥样硬化的免疫疗法或“疫苗”的过程,这些肽可以进一步用于检测。

[0136] 因此,我们已经证实了人类载脂蛋白 B 的 38 个不同序列可以使人体产生显著的免疫反应。这些抗原决定基有可能代表了之前所描述的抗氧化 LDL 的抗体。由于大多数免疫反应是针对肽序列的,载脂蛋白 B 为 LDL 中唯一的蛋白质,在该课题中所采用的方法应该可以用于确定几乎所有抗氧化 LDL 颗粒的抗体的特异性抗原决定基。我们已经描述了包括抗心磷脂抗体在内的、与氧化 LDL 反应的磷脂特异性抗体家族,但是这些抗体的特征和作用仍然有待进一步的研究和确认。

[0137] 在很多情况下,经 MDA 修饰的多肽的抗体滴度高于天然多肽序列的抗体滴度。如果检测到抗经 MDA 修饰的肽序列的抗体,则该抗体几乎总是与天然序列的抗体同时存在。该现象的一种可能解释是,机体对载脂蛋白 B 中经 MDA 修饰的氨基酸序列的免疫反应(由于 LDL 氧化而导致 MDA 修饰)导致机体终止了对天然序列的免疫耐受。对于其它序列,抗经 MDA 修饰的肽序列的抗体与抗天然序列的抗体滴度之间没有差异。其表明了,所述免疫反应针对的是天然序列。机体对正常暴露于免疫系统的蛋白中的氨基酸序列应该不产生免疫反应。在天然 LDL 颗粒中,载脂蛋白 B 的大部分隐藏在 LDL 的脂质层里面,因此,免疫系统不能接近该载脂蛋白。在 LDL 的氧化过程中,载脂蛋白 B 的氨基酸链断裂导致其三维构象发生改变。这就有可能导致其肽序列暴露于正常状态下不接近该肽序列的免疫系统,产生了针对这些序列的抗体,从而可以解释所观察到的存在有抗天然载脂蛋白 B 序列的抗体。另外一种解释,免疫反应实际上是针对经 MDA 修饰的序列,但是其与天然序列之间存在着显著的交叉反应,导致它们在结合率方面没有差异。

[0138] 表 2

[0139] 研究了 78 名受试者中不同肽的抗体与颈动脉中动脉粥样硬化之间的关系,其中用血管内膜/中膜的厚度评价颈动脉的动脉粥样硬化(78 名受试者中,有 26 名受试者在此之后发生了心肌梗塞,26 名受试者为健康对照,26 名为无疾病的高危个体)。

[0140]

肽	IgG		IgM	
	天然	经 MDA 修饰	天然	经 MDA 修饰
301				+
10			+	+
11			++	+
25	+	+	++	+++
30				++
31			++	++
32				++
33				+
34				+
45		++	++	+++
74	++	+	+	++
99				
100			+	++
102				++
103			+	
105				
129			++	+++
143	+	+	++	+
148				+
154			+++	++
162			+	++
199				
210			+	
240			++	++

[0141]

[0142] +, $> 0.2 < 0.3$, $p = < 0.05$; ++, $r > 0.3 < 0.4$, $p = 0.01$; +++, $r > 0.4$, $p = < 0.001$, 灰色, 发生心肌梗塞的受试组中肽抗体水平显著升高。

[0143] 在一个预实验中,我们研究了将基于这些肽(天然的或经MDA修饰的)的FLISA方法用于确定免疫反应与患有心血管疾病和/或患心血管疾病的风险之间的可能性,所述免疫反应是针对氧化LDL中确定的抗原决定基。该实验在参与Malmö饮食癌症研究的受试者中进行的,所述饮食癌症研究为一群体研究,在1989年至1993年,该研究共招募了30000多名受试者。其中26名受试者在随后的随访调查期间发生了急性心肌梗塞,选取了26名在年龄、性别以及吸烟方面相匹配的健康个体作为对照,测定了上述受试者基线血浆样品中的抗体值,这些抗体是表1所列38个肽中的24个肽的抗体。另外,还选择了26名LDL胆固醇水平平均高于5.0mmol/l、在年龄、性别以及吸烟方面相匹配的受试者,这些受试者作为未患有心血管疾病的高危组,并对他们的抗体水平进行研究。

[0144] 对于所分析的24个肽中的19个肽,经MDA修饰的肽的IgM抗体水平与颈动脉(内膜/中膜厚度)中动脉粥样硬化的严重程度显著相关,也就是说,抗体水平越高,动脉粥样硬化越严重。其中,通过对颈总动脉进行超声检查以评价动脉粥样硬化的严重程度(表2)。同时,这些肽中有多个肽的抗天然肽抗体水平和颈动脉内膜/中膜的厚度也具有显著的相关性。只有4个肽显示出其IgG抗体与颈动脉内膜/中膜的厚度之间存在显著的相关性。这些观察结果提示,用这些经MDA修饰的肽(单独使用或联合使用)的ELISA方法可以用于确定具有严重动脉粥样硬化的受试者。

[0145] 在所检测的肽中,有4个肽的抗体水平不仅与动脉粥样硬化的严重程度有关,而且在以后发生心肌梗塞的受试组中其抗体水平也显著升高(表2)。图7中为其中一个肽(肽240)的资料。这些观察结果同样证明了基于肽的ELISA方法还可以用来识别发生心肌梗塞的危险性较高的受试者。

[0146] 在之后发生心肌梗塞的受试者组中,天然肽103、162、199,以及经修饰的肽102的IgG抗体水平显著升高。但是,抗这些肽的IgG抗体与颈动脉中的动脉粥样硬化之间并没有显著的相关。

[0147] 在抗经MDA修饰的肽210的抗体方面,还观察到了一个非常有趣的结果,其中在健康对照组和高危组(LDL胆固醇高于5.0mmol/l)中,其IgM抗体水平显著高于以后发生心肌梗塞的受试者组的抗体水平。因此,抗经MDA修饰的肽210的抗体可以作为一种标志物,用于确认那些发生心肌梗塞的危险性较低的个体。

[0148] 目前已经证实,在实验动物中(Nordin Fredrikson, Söderberg等, Chyu等),用天然的以及经MDA修饰的apo B-100肽序列进行免疫,抑制了动脉粥样硬化。但是,这些具有动脉保护作用的免疫反应的机制仍然有待进一步的研究。然而,其中一种可能的解释是所述动脉保护的效应是由针对这些肽序列的抗体介导的。例如,这些抗体可以通过巨噬细胞的Fc受体促进对受到氧化受损的LDL颗粒的清除。

[0149] 巨噬细胞清除受体只识别受到广泛氧化损伤的LDL(9)。最近的研究已经确定了循环氧化LDL的存在(10,11)。这些颗粒只受到了极小的氧化损伤,因此不能被清除受体识别。抗体结合于这些循环氧化LDL颗粒上可以有助于在这些颗粒聚集到细胞组织之前。将这些颗粒从循环中清除出去(12)。

[0150] 已经有几个研究报道了抗体在抗动脉粥样硬化中的作用。在经脾切除的apo E裸鼠中,B细胞重建抑制了动脉粥样硬化的发生。在RAG-1小鼠中,颈动脉受损后,B细胞重建还抑制了动脉内膜的再生(我们实验室所观察到的结果,但是仍未发表)。而且,实验表

明,对 apo E 裸鼠重复注射免疫球蛋白减少了动脉粥样硬化的发生。

[0151] 如上所述,用合成的肽进行主动免疫,可以产生针对经 MDA 修饰的 apo B-100 肽序列的抗体。该过程需要 2-3 周的时间才能达到产生抗体的最大效果。

[0152] 在某些情况下,可能需要更加快速的效果。其中一个例子就是动脉粥样硬化斑块不稳定的情况,此时,氧化 LDL 有可能会引起炎症、产生细胞毒性以及存在斑块破裂的危险。在这些情况下,通过注射纯化的或重组生产的、针对天然以及经 MDA 修饰的序列的抗体进行被动免疫,可以达到较为快速的效果。

[0153] 通过注射纯化的或重组生成的抗体进行被动免疫从而起效用的另一种情况是老年人发生的冠心病。我们的研究表明,人的年龄越大,针对载脂蛋白 B 肽序列的抗体水平将减少,而且抗体水平的减少与血浆中氧化 LDL 水平的升高相关(Nordin Fredrikson, Hedblad 等)。这就提示了,产生针对氧化 LDL 中抗原的抗体的免疫细胞的衰老使氧化受损的 LDL 颗粒没有完全从循环中清除出去。因此,在这些受试者中,通过注入纯化的或重组生成的抗体进行被动免疫,比用载脂蛋白 B-100 肽序列进行主动免疫的效果要好。

[0154] 下列所使用的合成天然肽(Euro-Diagnostica AB, Malmö, 瑞典)为初次筛选出的多肽库中的肽 1, 2, 和 301。我们发现,在肽 1(氨基酸序列, EEEMLENVSLVCPKDATRFK, $n = 10$)和肽 301(氨基酸序列, HTFLIYITELLKKLQSTTV, $n = 10$)中,它们各自的针对经 MDA 修饰形式的 IgG 或 IgM 抗体反应高于天然肽,而且在健康受试者中两种抗体滴度均较高。选择这些肽的原因基于这样一个假设,即针对这些肽的抗体反应可能会起到抗动脉粥样硬化的保护作用。在初次的抗体筛选中,肽 2(氨基酸序列, ATRFKHLRKYTYNYQAQSSS, $n = 10$)并没有引发抗体反应,因此,将该肽选择作为对照肽。接受明矾的小鼠作为对照组($n = 9$)。

[0155] 在 6 至 7 周龄时,对载脂蛋白 E(-/-)小鼠进行皮下注射从而进行初次免疫,3 周后,进行腹膜内注射以加强免疫。从免疫一开始,就持续给予小鼠高胆固醇饮食,直到 25 周被处死。在处死小鼠时,4 组小鼠的各组之间在体重上没有显著区别。同时,用市售的试剂盒(Sigma)检测 4 组小鼠血清中的胆固醇,各组之间在统计学上没有显著性差异。各组平均血清胆固醇水平平均高于 715mg/dl。

[0156] 用油红 O 染色后,测量前位标本中降主动脉中被动粥样硬化斑块覆盖的面积。与对照组相比,用肽 2 和肽 301 进行免疫的小鼠,其动脉粥样硬化显著减少(图 2)。与对照组相比,用肽 1 进行免疫的小鼠,动脉粥样硬化并没有显著地减小。与降主动脉相反,主动脉根部和主动脉弓部的动脉粥样硬化的范围和程度在 4 个实验组之间并没有差别。

[0157] 在主动脉窦处,斑块的大小以及脂质含量在 4 个实验组之间并没有差异(表 A)。在主动脉弓部,斑块的平均尺寸在 4 组小鼠之间也没有差异。然而,在经油红 O 染色的降主动脉和腹主动脉中,对斑块大小进行前位评价,其结果表明,对照组和给予肽 No. 1 的实验组具有相似数量的动脉粥样硬化斑块,而在给予肽 No. 2 和肽 No. 9 的实验组中,其主动脉上的动脉粥样硬化斑块显著减少(表 A)。该观察结果表明,用肽进行免疫并不影响主动脉窦或主动脉弓部的斑块大小,但是却减少了降主动脉处的斑块,该结果非常有意思。同时,观察结果还提示了用肽进行免疫可以减少新斑块的形成,但是不影响斑块的进展。

[0158] 我们还进一步检验了用肽进行免疫是否可以调节动脉粥样硬化的表型。对主动脉窦处的斑块的冷冻切片用单核细胞/巨噬细胞抗体(MOMA-2, Serotec)进行免疫组化染色。与前位观察的结果一致,肽 No. 2 显著减少了巨噬细胞进入斑块内(图 1)。三色染色法

显示,给予肽 No. 2 的实验组中,主动脉窦的斑块中平均胶原含量为 $40.0 \pm 7.7\%$;在给予明矾的对照组,肽 No. 1 组,肽 No. 9 组中的平均胶原含量分别为 $32.3 \pm 5.3\%$, $35.6 \pm 8.5\%$, $29.4 \pm 9.6\%$ 。

[0159] 我们检测了每个实验组中针对免疫肽的抗体反应。在肽 No. 1 组中,抗体滴度在免疫后增加了 6.1 ± 3.1 倍,肽 No. 2 组增加了 2.4 ± 1.0 倍,肽 No. 9 组增加了 1.8 ± 0.6 倍;而明矾组的抗体滴度相对于肽 No. 1 组增加了 3.9 ± 2.7 倍,相对于肽 2 组增加了 2.0 ± 0.5 倍,相对于肽 9 组增加了 2.0 ± 0.9 倍。令人吃惊的是,在进行免疫的实验组以及给予明矾的实验组中,抗免疫肽的抗体滴度平行升高。其意味着以下几种可能性:1) 除了体液免疫反应之外(例如细胞免疫反应),动脉粥样硬化的调节还涉及到其它机制;或者 2) 抗体水平的升高是随着时间的变化机体对高胆固醇血症的一个副反应。

[0160] 尽管目前对为何用肽进行免疫可以减少动脉粥样硬化和/或调节斑块的表型这个问题仍然没有一个清楚的理论机制,但是该发明的新颖性在于其将 LDL 肽作为免疫原的理念,以及其作为免疫调节策略的可行性。这种基于肽的免疫策略对动脉粥样硬化斑块进行调节。研究表明,将同源性氧化 LDL 或天然 LDL 作为抗原进行免疫减少了斑块的大小¹⁻³,但是,同源人 LDL 的可得性,生产,感染以及安全性使得该方法在临床应用中并不具备吸引力。尽管我们所得到的最终结果与最初的假设不一样,本文中证实了基于肽的免疫疗法是可行的。我们的最初假设是在正常的受试者中使用肽进行免疫以产生较高的 IgM 或 IgG 抗体反应,可以防止实验动物发生严重的动脉粥样硬化斑块。

[0161] 在最初的人群筛选中,肽 No. 2 并没有引起任何的抗体反应,然而,在研究中我们惊奇地发现,用肽 No. 2 进行免疫可以防止动物的降主动脉发生新的动脉粥样硬化损伤,并减少了巨噬细胞的进入,同时斑块中的胶原含量也较高。其可能的原因是,(a) 肽 No. 2 可能是人类载脂蛋白 B-100 结构的一部分,其并不暴露于免疫系统。因此没有抗体产生,在健康人群的血清样品中也检测不到抗体;(b) 肽 No. 2 的氨基酸序列对于小鼠来说是外来的,因此小鼠产生了抗这种肽的抗体,从而减少了新的动脉粥样化损伤的形成以及其表型。

[0162] 在评价主动脉不同部位的斑块大小时,用同源 LDL 进行免疫的效果不一样。例如,Ameli 等人研究表明,在患有高胆固醇血症的兔子中,用天然 LDL 进行免疫导致主动脉上斑块形成减少¹,而 Freigang 等人研究表明,主动脉窦上的斑块变小,而不是位于主动脉上的斑块变小。结合他们的研究结果以及现有的研究结果,我们认为用肽进行免疫不仅调节斑块的大小还调节斑块的构成。我们只在降主动脉处观察到了斑块减少。众所周知,在单个动物的不同发育阶段,载脂蛋白 E(-/-) 小鼠可以发生动脉粥样硬化损伤,特别是给予高胆固醇饮食。在年幼的动物中,动脉粥样硬化损伤最初出现在主动脉窦上^{6,7},在 15 周以后,高脂高胆固醇饮食可以导致主动脉窦处的损伤发展成为晚期的斑块;而此时在降主动脉为动脉粥样硬化的早期⁶。由于斑块成熟需要一定的时间过程,而且降主动脉上的斑块发展慢于主动脉窦上的斑块发展,免疫作用可以减小降主动脉上的损伤大小而不降低主动脉窦上的损伤,该发现提示免疫作用影响动脉粥样硬化形成的早期阶段。一种可能是,当动物逐渐衰老时,以及当血清胆固醇的水平高于其生理状态下的水平时,高胆固醇血症的毒性作用超过了免疫作用的降低斑块效应。另外一种可能是,由于主动脉窦斑块成熟比较早,在 25 周处死动物太晚了,从而不能检测到斑块大小的区别。尽管主动脉窦处的损伤大小不能被减小,但是用肽进行免疫确实可以调节斑块的构成。目前实验设计不能研究降主动脉上的斑

块在形成的早期阶段时,其斑块的构成。

[0163] 实验研究结果突出表明了,使用与 LDL 相关的载脂蛋白 B-100 的肽序列作为免疫原作为防止动脉粥样硬化的一种新方法的可行性,或者尽管具有严重的高脂血症,其也可以有利地调节斑块的表型。与将同源性氧化 LDL 或天然 LDL 作为抗原相比,该基于肽的免疫策略具有优势,这是因为该策略不需要分离和制备同源 LDL,也没有随之而来的发生污染的危险性。用肽 No. 2 和 No. 301 进行免疫,只在降主动脉处观察到了减小斑块的作用。这些研究结果与之前的有关报道是一致的,这些报道表明,其他治疗干预措施在降主动脉处的效果要好于主动脉弓部的效果¹⁴⁻¹⁷,其可能是因为,主动脉根部和弓部的损伤比降主动脉处的损伤发展地快,从而在主动脉根部和弓部进行干预的机会要小^{14,15,16,18,19}。由于斑块成熟需要一定的时间过程,而且降主动脉上的斑块发展慢于主动脉窦上的斑块发展,免疫作用可以减小降主动脉上的损伤大小而不降低主动脉窦上的损伤,该发现提示免疫作用影响动脉粥样硬化形成的早期阶段。一种可能是,当动物逐渐衰老时,以及当血清胆固醇的水平高于其生理状态下的水平时,高胆固醇血症的毒性作用超过了免疫作用的降低斑块效应。尽管主动脉窦或主动脉弓部的损伤大小不能被减小,但是用肽 No. 2 进行免疫确实可以调节斑块的构成,使其向有利地方向发展,使斑块表型更加稳定,同时减少了巨噬细胞的进入,并增加了胶原的含量。总之,在鼠动物模型中证实了一种新的、以肽为基础的抑制动脉粥样硬化的免疫介导方法。

[0164] 综上所述,本发明显示了一种新的、以肽为基础的免疫介导方法,用于调节动脉粥样硬化的斑块。尽管在我们的模型中,动脉粥样硬化形成的改变是非常小的,但是这种以肽为基础的免疫方法为研究、预防或治疗动脉粥样硬化提供了另外一种手段。

[0165] 方法

[0166] 肽的制备使用Imject® SuperCarrier® EDC(Pierce, Rockford, IL),根据生产商的说明并进行细微的调整,制备肽。将行有 1mg 肽的 500ul 共轭缓冲液与含有 2mg 载体的 200ul 去离子水混合。然后,加入 1mg 共轭试剂(EDC,1-乙基-3-[3-二甲基氨丙基]碳二亚胺盐酸),在室温下孵化 2 小时。然后,用 PH7.2,含有 0.083M 磷酸钠和 0.9M 氯化钠的溶液进行透析,在 4℃下孵化过夜。透析后的共轭物用 Imject 干式混合纯化缓冲液进行稀释使其终体积达到 1.5 毫升。将明矾作为免疫佐剂,并与肽共轭物以 1 : 1 的比例混合。每次进行免疫注射的肽用量为 33ug/100ul。

[0167] 动物方案在 6-7 周周龄时,给予 Jackson 实验室(Bar Harbor, Me)ApoE(-/-)小鼠皮下注射进行初次免疫。3 周后,进行腹膜内注射以加强免疫。在进行免疫的一开始,就持续给予小鼠高胆固醇饮食,直至 25 周时处死小鼠。加强免疫后的 2 周,以及处死小鼠时采集小鼠的血样。对照组小鼠给予明矾。实验方案得到了 Cedars-Sinai 医学中心的社会机构动物监护和使用委员会(the Institutional Animal Care and Use Committee of Cedars-Sinai Medical Center)的同意和批准。所有的动物都饲养在经美国实验动物监护鉴定协会(American Association of Accreditation of Laboratory Animal Care)所鉴定的动物实验室中,并以 12 小时白天/黑夜为周期进行饲养。所有动物都可以自由地饮水和饮食。在处死动物时,给动物吸入安氟醚进行麻醉。在处死前,进行眼眶后取血。

[0168] 采集组织并进行切片为了评价用肽进行免疫对动脉粥样硬化形成的影响,对主动脉窦、主动脉弓部以及降主动脉和腹主动脉处的斑块大小进行评价。用生理盐水灌注心脏

和主动脉树,切除心脏和近主动脉,并包埋在 OCT 复合物中 (Tissue-Tek),然后进行冷冻切片。从至少出现两个主动脉瓣的地方直至主动脉瓣叶片消失的地方进行一系列的切片,切片厚度为 6 μ m,以评价主动脉窦处的斑块。通常,一个载玻片上有 3 个连续切片,一只小鼠共采集 25-30 张载玻片,每 50 张载玻片为一组进行染色。同时也对升主动脉,朝向左锁骨下动脉的主动脉弓部进行切片,并进行相似的处理。单独对降主动脉和腹主动脉进行处理,油红 O 染色后对斑块的构成进行前位评价。制备前位的降主动脉和腹主动脉的标本。

[0169] 将浓度为 0.8g/ml 的鸡蛋白蛋白 (Sigma) 水溶液与甘油以 1 : 1 的比例相混合。然后,加入叠氮钠,使叠氮钠的最终浓度达到 0.2%。将降主动脉和腹主动脉周围的组织和脂肪清除干净后,将左锁骨下动脉至肾主动脉的动脉部分小心地切除下来,然后在 Hisochoice (Amresco) 中进行固定,过夜。然后,小心地纵向打开动脉,将有空腔的一面放在用鸡蛋白蛋白溶液进行新鲜涂覆的载玻片上。当白蛋白溶液变干后,用油红 O 对动脉进行染色,然后用计算机辅助的组织形态测定技术评价动脉粥样硬化的程度。

[0170] 免疫组织化学和组织形态学主动脉窦的切片用 MOMA-2 抗体 (Serotec) 按照标准程序进行免疫组织化学染色。用三色染色法评价胶原含量,用油红 O 染色评价斑块的大小,用标准的染色程序评价脂质含量。进行计算机辅助的形态测定分析从而进行如前所述的组织形态学测定⁸。

[0171] 抗体滴度的测量为了测定用肽进行免疫后的抗体反应,进行了 ELISA 检测。对加强免疫后两周的血样以及处死时血样进行了检测,测定了其中的抗免疫肽的抗体滴度。同时,对给予明矾的对照组也测定了相同时间点的抗 3 个肽的抗体反应。简而言之,用 PH7.4 的 PBS (20 μ g/ml) 稀释合成的天然肽,然后将其加入微孔滴定板的小孔中 (Nunc, MaxiSorp, Nunc, Roskilde, 丹麦) 进行包被,在 4 $^{\circ}$ C 下孵化过夜。用含有 0.05% Tween-20 的 PBS (PBS-T) 洗板,然后在室温下,用含有 Superblock 的 TBS 溶液 (Pierce, Rockfor, IL) 封闭所述经包被的板 5 分钟,随后加入用含有 0.05% Tween-20 的 TBS (TBS-T) 以 1 : 100 的比例稀释所收集到的人血浆池,并加入反应板中,在室温下孵化 2 小时,然后在 4 $^{\circ}$ C 下孵化过夜。洗板后,用生物素标记的兔抗鼠 Ig 抗体 (Dako A/S, Glostrup, 丹麦) 检测沉积的针对所述肽的抗体,所述兔抗鼠抗体用 TBS-T 进行适当地稀释,在室温下,继续孵化 2 小时;然后,洗板,用碱性磷酸酶结合的抗生蛋白链菌素 (Sigma) 检测结合的生物素标记的抗体,在室温下孵化 2 小时。用磷酸酶底物试剂盒 (Pierce) 进行显色反应,在室温下孵化 1 小时后,在 405nm 处测量吸光度。减去背景值,然后计算出平均值。

[0172] 当然也可以采用其它的检测方法,包括检测抗体的免疫检测方法,例如,放射免疫检测法,Western 杂交, Southern 杂交,以及检测结合于肽的抗体,酶电极和其它分析方法。

[0173] 统计

[0174] 所有的结果以平均值 $\pm$ std 的形式表示。所使用的统计方法见正文,表或附图说明。 $p < 0.05$ 为具有统计学显著性。

[0175] 表 A 主动脉窦处的斑块大小和脂质含量,主动脉弓部的斑块大小,降主动脉处斑块的百分数

[0176]

	主动脉窦处总的斑块大小 (mm ²)	油红 O 染色为 (+) 的面积 (主动脉窦处的斑块百分数)	主动脉弓部斑块的 大小 (mm ²)	主动脉的斑块百分数 (脂肪百分数)
明矾	0.49±0.13	21.7±4.4	0.057±0.040	20±4.7
肽 1	0.48±0.14	32.0±8.1	0.054±0.027	17±4.3
肽 2	0.52±0.12	23.9±3.5	0.0780±0.022	6.3±1.9*
肽 301	0.46±0.16	23.8±4.1	0.050±0.024	8.9±2.2*

[0177] * 显著区别于给予明矾的对照组。统计方法采用了 Tukey-Kramer 检验方法,并采用了 ANOVA 分析。

[0178] 用载脂蛋白 B-100 的肽序列对剔除载脂蛋白 E 的小鼠进行免疫后,其对动脉粥样硬化的影响的资料见表 B

[0179] 表 B 用载脂蛋白 B-100 的肽序列对剔除载脂蛋白 E 的小鼠进行免疫后,其对动脉粥样硬化的影响的资料见表 B

[0180] 用几种肽序列的混合物进行免疫

[0181] 对主动脉的动脉粥样硬化的影响

[0182] 1. 肽序列 143 和 210 -64.6%

[0183] 2. 肽序列 11,25 和 74 -59.6%

[0184] 3. 肽序列 129,148 和 167 -56.8%

[0185] 4. 肽序列 99,100,102,103 和 105 -40.1%

[0186] 5. 肽序列 30,31,32,33 和 34 +6.6%

[0187] 6. 肽序列 10,45,154,199 和 240 +17.8%

[0188] 用单个肽序列进行免疫

[0189] 1. 肽序列 2 -67.7%

[0190] 2. 肽序列 210 -57.9%

[0191] 3. 肽序列 301 -55.3%

[0192] 4. 肽序列 45 -47.4%

[0193] 5. 肽序列 74 -31.0%

[0194] 6. 肽序列 1 -15.4%

[0195] 7. 肽序列 240 0%

[0196] 通常,通过注射的方法给予肽,例如皮下注射,静脉内注射,肌肉注射或腹膜内注射。根据每个病人的体重,年龄以及其它物理和医疗条件确定第一次免疫用的剂量,其剂量为 1-100mg。在特殊情况下,也可以通过导管向冠状血管中局部给予含有一种或多种肽的溶液。也可以口服含有所述肽的制剂,但是,必须考虑到一些特殊情况以使口服制剂能够吸收进入血流。一次注射用剂量可以含有重量百分比为 0.5%—99.5%的本发明中所述的一种

或多种片段或肽。

[0197] 通常,将所述肽连接于阳离子牛血清白蛋白上,并同时给予,将白蛋白氢氧化物作为佐剂。也可以使用本领域所公知的其它佐剂。

[0198] 用于给予所述肽的溶液不能含有任何的 EDTA 或抗氧化剂。

[0199] 对于已经患有动脉粥样硬化的病人,所述肽也可以作为治疗剂。因此,可以采用任何一种适当的给药途径添加本发明的一种或多种片段或肽。

[0200] 最初一些研究的重点是确定肽的何种氧化修饰可以导致其被人类血浆中的抗体识别。在这些研究中使用了肽 No. 1-5 以及 No. 297-302。在 LDL 氧化的过程中,磷脂中的多不饱和脂肪酸以及胆固醇酯经历了预氧化,从而形成了具有高反应性的断裂产物,例如丙二醛 (MDA)。MDA 可以与 apo B-100 中的赖氨酸和组氨酸残基形成共价加合物,从而使它们具有高度的免疫原性。LDL 氧化还导致 apo B-100 分裂,从而使正常状态下不能被免疫系统接近的肽序列暴露于免疫系统中。在这些实验中,采用了肽的天然形态,或经过 MDA 修饰,或者在用铜氧化或 MDA 修饰后结合于磷脂脂质体上。在上述研究中,检测了针对天然肽、经 MDA 修饰的肽以及结合于脂质体上的氧化肽的 IgM 抗体,它们的抗体滴度分别为经 MDA 修饰的肽 > 经 MDA 修饰的脂质体肽 > 结合于脂质体的氧化肽 > 天然肽。特异性试验表明 MDA-LDL 以及经铜氧化的 LDL 竞争性结合于针对经 MDA 修饰的肽的抗体。

[0201] 然后,我们将天然形态的和经 MDA 修饰的肽作为抗原,用从健康对照受试者中收集来的血浆样品,对完整的肽库进行筛选。确定了针对 apo B-100 上多个位点的抗体。将对照的背景吸光度的两倍作为阳性滴度的判定值,检测了构成完整 apo-100 肽序列库的 302 个肽中的 102 个肽的抗体。IgM 的结合率明显高于 IgG 的结合率。总体上来说,抗体与经 MDA 修饰的肽的结合率高于与相应的天然肽序列的结合率,但是两者之间有着显著的相关性。经 MDA 修饰的 LDL 和经铜氧化的 LDL 与天然形式的肽序列和经 MDA 修饰的肽序列竞争性结合于抗体,但是,天然 LDL 并不参与所述的竞争性结合。这些观察结果表明,针对 apo B-100 中经 MDA 修饰的肽序列的免疫反应与天然序列之间存在着交叉反应性。天然 LDL 不竞争结合于结合天然 apo B-100 肽序列的抗体的现象是非常有趣的,但是,其可能提示了,只有经过 LDL 氧化,导致 apo B-100 发生了蛋白分解,此时这些肽序列才暴露出来。所述肽分子的亲水和亲水部分被抗体识别。用从具有冠心病临床症状 [CHD, 急性心肌梗塞 (AMI)、不稳定心绞痛; n = 10] 的受试者中所收集的血浆样品,对 apo B-100 肽库进行第二次筛选。所收集的 CHD 血浆中的抗体与健康对照受试者血浆中的抗体结合于同样的肽序列,而且其分布也与健康对照受试者血浆中的抗体分布一致。然而,在 CHD 受试者的血浆中,针对几种肽 (编号为 1, 30-34, 100, 107, 148, 149, 162, 236, 252 以及 301) 的抗体滴度至少是健康对照受试者血浆中抗体滴度的两倍,此外,CHD 患者血浆中还有几种肽 (编号为 10, 45, 111, 154, 199, 222 以及 240) 的抗体滴度高于对照组。然后,我们进行了一项前瞻性临床研究,以调查针对 apo B-100 中经 MDA 修饰的肽序列的抗体水平能否用于预测发生 CHD 的危险。采用嵌套式病例对照研究设计,我们从 Malmo 饮食癌症研究项目中选择了 78 名冠状动脉出现重大病变的受试者 (AMI 或死于 CHD), 以及 149 名对照人群。病例组和对照组中的受试者之前均没有发生 MI 或中风的病史。在病例组中,从采集血样到发生急性冠状动脉疾病的中位数时间为 2.8 年 (范围为 0.1-5.9 年)。测定加入抗氧化剂的基线血浆样品中的抗体水平。采用超声波检查法评价了颈动脉内膜-中膜的基线厚度 (IMT), 我们同时还分析了抗体

浓度和所存在的血管疾病的严重程度之间的关系。我们研究了 8 个在初次筛选研究与血浆中高抗体水平相关（编号为 74, 102 以及 210），和 / 或对照组血浆池与 CHD 血浆池之间存在明显差异（编号为 32, 45, 129, 162 以及 240）的经 MDA 修饰的肽序列。我们发现，对照组中针对经 MDA 修饰的肽 74 的 IgM 抗体水平较高（对照组 0.258，吸光度范围为 0-1.123；病例组 0.178，吸光度范围为 0-0.732, $p < 0.05$ ），而对于其它的肽，病例组和对对照组之间的抗体水平没有差异。我们观察到了，在病例组中，IMT 和针对经 MDA 修饰的肽 No. 102, 129 以及 162 的 IgM 抗体之间存在着相关性（ r 分别为 0.233, 0.232, 0.234, $p < 0.05$ ），在对照组中，IMT 与针对经 MDA 修饰的肽 45 的 IgM 抗体之间也存在着相关性（ $r = 0.18$, $p < 0.05$ ）。针对经 MDA 修饰的肽 129 的抗体以及总胆固醇和 LDL 胆固醇之间存在着微弱的相关性（ r 分别等于 0.19, 0.19, $p < 0.01$ ），其它肽的抗体水平与总的血浆胆固醇，LDL 胆固醇，HDL 胆固醇或血浆甘油三酯之间没有表现出相关性。针对不同肽的抗体水平之间存在着显著的协相关（ r 值范围 0.6-0.9）。其中只有一个例外，那就是经 MDA 修饰的肽 74 的抗体与其它肽的抗体之间存在着微弱的相关性或不具有相关性。

[0202] 在病例组中，除了经 MDA 修饰的肽 74，所有肽序列的抗体与年龄存在着负相关（ r 值范围 0.38-0.58, $p < 0.01$, 0.001），但是在对照组中不存在这种负相关。相反的是，血浆中氧化 LDL 的水平随着年龄的增长而升高。而且，这种相关性在病例组中比对照组中更加显著。为了研究针对经 MDA 修饰的肽序列的免疫反应与心血管疾病之间的关系在不同的年龄组中是否不同，我们对病例组和对照组进行了年龄分组分析，分为年龄中位数（61 岁）以下和以上两组。在年龄较小的组中，与对照组相比，病例组中肽 32 和 45 的抗体水平较高，肽 74 的抗体水平较低，但是在高年龄组中没有观察到差异。在年龄较小的组中，除了肽 74，所有经 MDA 修饰的肽序列的抗体均与 IMT 具有显著的相关性，而在高年龄组中不存在上述情况。（表）

[0203] 这些研究确定了 apo B-100 中存在的多个被人类抗体所识别的经 MDA 修饰的肽序列。由于 LDL 氧化所导致的 apo B-100 的 MDA 修饰表明这些抗体属于上文所描述的抗氧化 LDL 的自身抗体家族。该结论同样得到了以下观察结果的支持，即结合于经 MDA 修饰的 apo B-100 肽的抗体也被氧化 LDL 竞争性结合。与 Horkko 等人所确定的氧化磷脂一起，这些经 MDA 修饰的肽序列有可能构成了氧化 LDL 的绝大部分具有抗原性的结构。与氧化 LDL 的抗磷脂抗体类似，经 MDA 修饰的 apo B-100 序列的抗体类型为 IgM 型。这就提示了，后者抗体也可能属于 T15 自然产生的抗体家族。T 15 抗体在抗细菌感染的 T 细胞非依赖性免疫反应中起着重要的作用，同样在清除凋落细胞中也起着非常重要的作用。但是，我们仍需要进一步确定本文所描述的经 MDA 修饰的肽的抗体是否也具有类似功能。此外，我们还检测了多个天然 apo B-100 序列的抗体。然而，天然肽的抗体和经 MDA 修饰的肽的抗体之间所存在的显著共变性提示了，这些抗体同样也是在针对 LDL 氧化的免疫反应中形成的。此外还存在这样的可能，那就是经 MDA 修饰的肽序列的抗体与相应的天然肽序列之间存在着交叉反应性。如果抗天然 apo B-100 序列的抗体同样结合于天然 LDL 颗粒，这就有可能对 LDL 的代谢产生重大影响。然而，发现表明天然 LDL 并不竞争性结合于抗天然 apo B-100 序列的抗体，而且抗天然 apo B-100 序列的抗体与 LDL 胆固醇水平之间缺乏相关性，从而否定了上述现象的存在。

[0204] 在病例组中，经 MDA 修饰的肽序列的抗体水平随着年龄的增长而进行性地下降，

但是在对照组中不存在这种现象。在年龄较小的组中(62岁以下),除了经MDA修饰的肽74,经MDA修饰的肽的IgM抗体与颈动脉IMT之间存在着显著的相关性,但是在年龄较大的组中不存在这种相关性。这些发现表明,在50岁到70岁之间,免疫系统和动脉粥样硬化血管壁之间的相互作用发生了显著的变化。其中一种可能性是,在较年轻的个体中,动脉粥样硬化疾病的过程处于一个较为活跃的阶段,其中免疫细胞显著地参与该过程。另一种可能性是,在年老的个体中,经MDA修饰的肽序列的抗体水平下降反映了参与动脉粥样硬化过程的免疫细胞也衰老了。有人认为,免疫衰老所引起的免疫细胞功能损伤导致了老年人感染和癌症的易感性升高。有趣的是,抗氧化剂可以抑制免疫衰老,其提示了免疫衰老过程中涉及了氧化因素。尤其是,与氧化LDL的抗原决定基之间具有相互作用的免疫细胞有可能暴露于氧化因素中。由于在年幼的时候,氧化LDL就已经存在于动脉中,因此,免疫反应一直被持续激发了数十年,从而进一步加剧了免疫衰老的发生。

[0205] 我们发现,针对apo B-100中两个位点的抗体可以用于预测年龄在62岁以下的受试者中发生心肌梗塞和冠状动脉死亡的危险性。针对这两个位点的抗体之间具有高度的共变性,其提示了,这些抗体是针对同一潜在的病理过程的反应所产生的。从采集血样至发生重大冠状动脉病变的中位数时间仅仅为2.8年的事实表明,这些特别受关注的抗体可以作为CHD危险升高的标记物。经MDA修饰的apo B肽序列的抗体水平与其它CHD危险因素之间没有表现出相关性,例如高脂血症、高血压、糖尿病,其表明这些抗体是独立的患有CHD危险的标记物。在本研究中,CHD病例并不是具有极高危险性的个体,他们只代表了普通的CHD患者。结果表明,经MDA修饰的apo B肽序列的IgM抗体可以预测个体在短期内发生急性冠状动脉病变的危险,通过对目前所确定的危险因素进行筛选并没有确定所述个体为高危人群,这就提示了,经MDA修饰的apo B-100肽序列的IgM抗体可以成为确定那些需要进行积极预防治疗的个体的一种重要的手段。然而,在完全确定针对经MDA修饰的apo B-100肽序列的抗体的临床值之前,需要更多的、更大规模的、进行多因素分析的前瞻性研究。本发明中的临床研究的另一个不足是,我们仅仅分析了针对apo B-100中一小部分抗原位点的抗体,可能针对其它位点的抗体滴度可以更好地作为发生心血管疾病危险的标记物。

[0206] 在年龄60岁以下的受试者中,针对apo B-100中大量经MDA修饰的位点的抗体与所存在的血管疾病的范围和程度之间具有相关型,所述血管疾病的范围和程度是通过颈动脉IMT进行评价的。IgM抗体与颈动脉IMT的关系比IgG抗体更加密切。尽管将颈动脉IMT用于评价总体动脉粥样硬化的程度具有明显的局限性,但是这些研究结果仍然提示了,测定针对apo B-100中经MDA修饰的肽序列的IgM抗体可以作为评价所存在的动脉粥样硬化严重程度的一种方法。这些观察结果与在此之前的其它几个研究一致,这些研究报道了冠状动脉疾病、颈动脉疾病以及抗氧化LDL的IgM抗体之间的关联。

[0207] 抗肽74的抗体在很多方面不同于其它apo B-100肽的抗体。在对照组中抗肽74的抗体高于病例组,随着年龄的增长这些抗体并不减少,这些抗体与颈动脉疾病的程度之间没有联系。因此,抗该肽序列的抗体可以作为具有动脉保护效应的免疫反应的候选物质。

[0208] 一种非常重要的问题是何存在这样的联系。这些联系清楚地表明,针对经MDA修饰的apo B-100位点的免疫反应在一定程度上参与了动脉粥样硬化疾病的病程。由于高抗体水平与较为严重的动脉粥样硬化,以及发生急性冠状动脉疾病的高危险性有关,一个显而易见的可能性就是,这些免疫反应促进了动脉粥样化。有研究表明,针对例如HSP65等

热休克蛋白的免疫反应促进动脉粥样化,这些研究支持了上述观点。然而,实验动物研究表明,用氧化 LDL 进行免疫具有保护动脉的作用。对切除脾的 apo E 裸鼠进行 B 细胞重建导致动脉粥样硬化降低。对 apo E 裸鼠进行反复注射免疫球蛋白也观察到了动脉粥样硬化的减少。本发明中的观察结果并不足以反驳针对氧化 LDL 的免疫反应所具有的动脉保护作用。这些免疫反应是由促进动脉粥样化的过程所激发的,例如,LDL 氧化。因此,这些免疫反应同样有可能与上述疾病的严重程度之间具有一定的比例关系,可以作为疾病严重程度和发生 CHD 危险的标记物,但是其并不促使疾病向前发展。在两篇论文中所报道的研究结果表明,用 apo B-100 肽序列免疫 apo E 裸鼠抑制了动脉粥样硬化的发生和发展,其提示了有可能就是如上所述的情况。实际上,本研究最重要的结果可能是确定了可以作为抗动脉粥样硬化疫苗组成部分的结构。研究结果表明,随着年龄的增长,apo B-100 中经 MDA 修饰肽序列的抗体而水平减少,同时还伴有血浆中氧化 LDL 水平的升高,其提示了,增加循环中极少量氧化 LDL 的清除率可能是这些抗体具有防止动脉粥样硬化的一个机制。

[0209] 方法

[0210] 研究人群

[0211] 本研究的受试者出生于 1926-1946 年间,为 Malmo “饮食和癌症 (MDC)” 研究队列中的受试者。在 1991 年 11 月至 1994 年 2 月期间,我们从参与 MDC 研究的受试值中随机选取了 50% 的受试者,参与颈动脉疾病的流行病学研究。在进行健康检查之后,确定了有关发病率和致死率等方面的信息,以及传统危险因素的定义,并对确定的方法和定义进行了报道。

[0212] 确定了有 85 例急性冠状动脉性心脏疾病,也就是,致死性或非致死性的心肌梗塞 (MI) 或由冠心病 (CHD) 所导致的死亡。具有心肌梗塞或中风 ($n = 6$) 病史的参与者为不合格者,不能参加本研究。对于每个病例,选取两个在年龄、性别,吸烟习惯、有无高血压、参与筛选检查的月份、随访的时间等方面相匹配的对照者,所述对照者没有心肌梗塞或中风的病史。由于后勤方面的原因 (血样量不够,不足以对肽进行测定),有 7 名病例只有一个对照者,有 1 名病例没有对照者。分析时,剔除了该名病例。因此,本研究人群包括 227 名受试者,其中有 78 名病例,149 名对照,在进入研究时,他们的基线年龄在 49-67 岁之间 (年龄中位数为 61 岁)。

[0213] 实验室分析

[0214] 采集过夜禁食后的血样,检测血清中总胆固醇、甘油三酯、HDL 胆固醇、LDL 胆固醇和全血血糖的浓度。根据 Friedwald 公式计算 LDL 胆固醇浓度,其单位是 mmol/l。用 ELISA 方法 (Mercordia) 检测氧化 LDL。

[0215] B 型超声血管检测

[0216] 用具有兆赫兹传感器的 Acuson 128 计算机断层系统 (CT) (Acuson, Mountain View, 加利福尼亚) 对右颈动脉的颈动脉斑块进行评价,如上文所述。

[0217] 用 ELISA 方法检测 apo B-100 肽序列

[0218] 合成 302 个对应于人类载脂蛋白 B 完整氨基酸序列的肽 (Euro-Diagnostica AB, 瑞典,以及 KJ Rose Petersen AS, Horsholm, 丹麦),并将它们用于 ELISA 分析中。在 37°C 下,用 0.5M MDA (Sigma-Aldrich Sweden AB, 斯德哥尔摩,瑞典) 处理所述合成肽 3 小时,对每个经合成的肽的一部分进行修饰,或在脂质体存在的情况下,用 0.5M MDA 在 37°C 下处理

3 小时,或在 37℃ 下,用 5mM CuCl_2 (Sigma) 处理 18 小时。然后在 4℃ 下,用含有 1mM EDTA 的 PBS 溶液对所述经 MDA 修饰的肽进行透析 18 小时,中间更换 PBS 溶液数次。在适于分离肽的变性聚丙烯酰胺凝胶 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 上检测经修饰的肽。

[0219] 将摩尔比为 9 : 1 的卵磷脂 (EPC) (Sigma) 和磷脂酰丝氨酸 (PS) (Sigma) 的氯仿溶液,与浓度为 3mM 的磷脂 (PL) 溶液进行混合,然后,在玻璃容器中用缓慢的氩气流进行吹干。然后,将容器放在真空状态下 3 小时。取 5ml 含有 0.1mM 肽、经无菌过滤的 PH 为 7.4 的 10mM HEPES 缓冲液、45mM NaCl、0.003% 叠氮钠的溶液加入 EPC/PS 干燥层,并在 50℃ 下孵化 15 分钟。在室温下,轻微振荡所述混合物,然后将其放于冰水中,用振幅为 7.5 微米的微波进行超声降解 3×3 分钟 (Sonyprep 150 MSE Sanyo, Tamro-medlab, 瑞典),每次间隔 1 分钟。将所述 PL-肽混合物贮存于玻璃小瓶中,并位于氩气下面,瓶的外周用铝箔包裹,在 4℃ 下贮存,并在 1 周内使用。所述 PL-肽混合物为天然形态,或是用 0.5M MDA 在 37℃ 下进行处理 3 小时,或是用 5mM CuCl_2 在 37℃ 下处理 18 小时。在贮存前,所述经 MDA 修饰的混合物需要在 4℃ 下用含有 1mM EDTA 的 PBS 对其进行透析 18 小时,中间更换 PBS 溶液数次。在适于分离肽的变性聚丙烯酰胺凝胶 (Bio-Rad Laboratories AB, Sundbyberg, 瑞典) 上检测所述经修饰的混合物。

[0220] 不论有无脂质体,用 PH 为 7.4 的 PBS (201 μ g/ml) 溶液稀释天然或经修饰的合成肽,并用其包被微孔滴定板的小孔 (Nunc MaxiSorp, Nunc, Roskilde, 丹麦),在 4℃ 下孵化过夜。作为对照,在每块板上都加入其中的一个肽 (P6)。用含有 0.05% Tween-20 的 PBS (PBS-T) 溶液洗板,然后在室温下,用含有 Superblock 的 TBS 溶液 (Pierce, Rockford, IL) 封闭所述经包被的板 5 分钟,用含有 0.05% Tween-20 的 TBS (TBS-T) 溶液以 100 : 1 的比例稀释所收集到的人血浆样品,并将稀释后的血样加入反应板中,在室温下孵化 2 小时,然后在 4℃ 下孵化过夜。洗板后,用生物素标记的兔抗鼠 Ig 抗体 (Dako A/S, Glostrup, 丹麦) 检测沉积的针对所述肽的抗体,所述兔抗鼠抗体用 TBS-T 溶液进行适当地稀释,在室温下,继续孵化 2 小时;然后,洗板,用碱性磷酸酶结合的抗生蛋白链菌素 (Sigma) 检测结合的生物素标记的抗体,在室温下孵化 2 小时。用磷酸酶底物试剂盒 (Pierce) 进行显色反应,在室温下孵化 1 小时后,在 405nm 处测量吸光度。将每个肽的吸光度值除以 P6 的吸光度值,进行比较。

[0221] 统计

[0222] 用 SPSS 进行统计分析。所得结果以中位数和范围表示,适当的时候用比例表示。用框图或散点图解释病例组和对照组中年龄和所选择的肽之间的关系。此外,分别在对照组和病例组中,用相应的图形解释基线年龄在中位数 (61 岁) 之下和之上的亚组之间年龄和所选择的肽之间的关系,并单独地用相应图形解释病例组和对照组中年龄在中位数以下时年龄和所选择的肽之间的关系。单独计算病例组和对照组中所选择的肽和血脂水平,以及颈总动脉 IMT 之间的、经年龄和性别调整后的偏相关系数。同时,对病例组和对照组中年龄在中位数 (61 岁) 之下和之上的亚组,计算颈总动脉 IMT 和所选择的肽之间的经年龄和性别调整后的偏相关系数。对符合正态分布的连续变量,用独立样本 t 检验进行统计分析,用卡方 (χ^2) 检验比较病例组和对照组之间的比例。用非参数检验的方法 (Mann-Whitney) 评价病例组和对照组之间不符合正态分布的连续变量之间的差异。所有的 P 值都是双向的。

[0223] 表

[0224] 患有心肌梗塞的病例组以及相应的在年龄、性别、吸烟、高血压方面相匹配的对照组在年龄较小组（49-61 岁）和年龄较大组（62-67 岁）中基线 MDA- 肽和颈动脉内膜 - 中膜厚度之间经年龄和性别调整后的偏相关系数

肽		病例组加对照组	病例组加对照组
		<u>年龄在 49-61 岁, n=116</u>	<u>年龄在 62-67 岁, n=111</u>
[0225]	IgM		
	MDA 32	0.235t	-0.101
	MDA 45	0.366\$	-0.030
	MDA 74	0.178	0.063
	MDA 102	0.255\$	-0.039
	MDA 129	0.330\$	-0.009
	MDA 162	0.2451	0.001
	MDA 210	0.254	0.013
	MDA 240	0.284\$	0.006
	IgG		
	MDA 215	0.119	-0.059

P<0.05;\$/x0.01

[0226] 参考文献

[0227] 1. Amell S et al. Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits.

[0228] 2. Freigang S, Horkko S, Miller E, Witztum J. L. & Palinski W. Immunization of LDL receptor-deficient mice with homologous malondialdehyde-modified and native LDL reduces progression of atherosclerosis by mechanisms other than induction of high titers of antibodies to oxidative neoepitopes.

[0229] 3. George J et al. Hyperimmunization of apo-E-deficient mice with homologous malondialdehyde low-density lipoprotein suppresses early atherogenesis. Atherosclerosis 138, 147-152 (1998)

[0230] 4. Alving C. R. et al. Immunization with cholesterol-rich liposomes induces anticholesterol antibodies and reduces hypercholesterolemia and plaque formation. J. Lab. Clin. Med. 127, 40-49 (1996).

[0231] 5. Hou X, Caligiuri G, Hamsten A, Lefvert A. K & Hansson G. K. LDL immunization induces T-cell-dependent antibody formation and protection against atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 21, 108-144 (2001)

[0232] 6. Nakashima Y, Plump A. S., Raines E. W., Breslow J. L. & Ross

R. Apo-E-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14,133-140(1994)

[0233] 7. Reddick R. L. , Zhang S. H. & Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* 14, 141-147(1994)

[0234] 8. Shah P. K. et al. Effects of recombinant apolipoprotein A-I (Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 97, 780-785(1998)

[0235] 9. Glass, C. K. & Witztum, J. L. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* 104, 503-16(2001)

[0236] 10. Holvoet, P. , Vanhaecke, J. , Janssens, S. , Van de Werf, F. & Collen, D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 98, 1487-94(1998)

[0237] 11. Ehara, S. et al. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 103, 1955-60(2001)

[0238] 12. Krych-Goldberg, M. & Atkinson, J. P. Structure-function relationship of complement receptor type 1. *Immunol Rev* 180, 112-22(2001)

[0239] 13. Nicoletti, A. , Caligiuri, G. , Paulsson, G. & Hansson, G. K. Functionality of specific immunity in atherosclerosis. *Am Heart J* 138, 5438-43(1999)

[0240] 16. Chobanian, A. V. Haudenschild, C. C. , Nickerson, C. & Drago, R. Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe Heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension* 15, 327-32(1990)

[0241] 17. Inoue, I. et al. Macrophage colony stimulating factor prevents the progression of atherosclerosis in the Watanabe Heritable hyperlipidemic rabbit. *Atherosclerosis* 93, 245-54(1992)

[0242] 18. Bourassa, P. A. , Milos, P. M. , Gaynor, B. j. , Breslow, J. L. & Aiello, R. J. Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10022-7(1996)

[0243] 19. Sparrow, C. P. et al. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 115-21(2001)

[0244] 20 Nakashima, Y. , Plump, A. S. , Raines, E. W. , Breslow, J. L. & Ross, R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14, 133-40(1994)

[0245] 21 Palinski, W. et al, ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb* 14, 605-16(1994)

附图说明

[0246] 附图 1-6 表示针对本发明中所制备的不同肽的抗体反应。

[0247] 图 1 :经 MDA 修饰的肽 1-100 的 IgG 抗体。

[0248] 图 2 :经 MDA 修饰的肽 . 101-200 的 IgG 抗体。

[0249] 图 3 :经 MDA 修饰的肽 201-302 的 IgG 抗体。

[0250] 图 4 :经 MDA 修饰的肽 1-100 的 IgM 抗体。

[0251] 图 5 :经 MDA 修饰的肽 101-200 的 IgM 抗体。

[0252] 图 6 :经 MDA 修饰的肽 201-302 的 IgM 抗体。

[0253] 序列信息

[0254] 序列 :Seq. ID NO 1

[0255] 来源 :载脂蛋白 B 的片段

[0256] 长度 :20

[0257] 类型 :氨基酸肽

[0258] 链 :单链

[0259] 拓扑 :线性

[0260] FLDTVYGNCSHTFTVKTRKG

[0261] 序列 :Seq. ID NO 2

[0262] 来源 :载脂蛋白 B 的片段

[0263] 长度 :20

[0264] 类型 :氨基酸肽

[0265] 链 :单链

[0266] 拓扑 :线性

[0267] PQCSTHILQWLKRVHANPLL

[0268] 序列 :Seq. ID NO 3

[0269] 来源 :载脂蛋白 B 的片段

[0270] 长度 :20

[0271] 类型 :氨基酸肽

[0272] 链 :单链

[0273] 拓扑 :线性

[0274] VISIPRLQAEARSEILAHWS

[0275] 序列 :Seq. ID NO 4

[0276] 来源 :载脂蛋白 B 的片段

[0277] 长度 :20

[0278] 类型 :氨基酸肽

[0279] 链 :单链

[0280] 拓扑 :线性

[0281] KLVKEALKESQLPTVMDFRK

[0282] 序列 :Seq. ID NO 5

[0283] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0284] 长度 :20
[0285] 类型 :氨基酸肽
[0286] 链 :单链
[0287] 拓扑 :线性
[0288] LKFVTQAEGAKQTEATMTFK
[0289] 序列 :Seq. ID NO 6
[0290] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0291] 长度 :20
[0292] 类型 :氨基酸肽
[0293] 链 :单链
[0294] 拓扑 :线性
[0295] DGSLRHKFLDSNIKFSHVEK
[0296] 序列 :Seq. ID NO 7
[0297] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0298] 长度 :20
[0299] 类型 :氨基酸肽
[0300] 链 :单链
[0301] 拓扑 :线性
[0302] KGTYGLSCQRPNTGRLNGE
[0303] 序列 :Seq. ID NO 8
[0304] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0305] 长度 :20
[0306] 类型 :氨基酸肽
[0307] 链 :单链
[0308] 拓扑 :线性
[0309] RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ
[0310] 序列 :Seq. ID NO 9
[0311] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0312] 长度 :20
[0313] 类型 :氨基酸肽
[0314] 链 :单链
[0315] 拓扑 :线性
[0316] SLTSTSDLQSGIINKNTASLK
[0317] 序列 :Seq. ID NO 10
[0318] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0319] 长度 :20
[0320] 类型 :氨基酸肽
[0321] 链 :单链

- [0322] 拓扑:线性
- [0323] TASLKYENYELTLKSDTNGK
- [0324] 序列:Seq. ID NO 11
- [0325] 来源:载脂蛋白 B 的片段
- [0326] 长度:20
- [0327] 类型:氨基酸肽
- [0328] 链:单链
- [0329] 拓扑:线性
- [0330] DMTFSKQNALLRSEYQADYE
- [0331] 序列:Seq. ID NO 12
- [0332] 来源:载脂蛋白 B 的片段
- [0333] 长度:20
- [0334] 类型:氨基酸肽
- [0335] 链:单链
- [0336] 拓扑:线性
- [0337] MKVKIIRTIDQMQNSQLQWP
- [0338] 序列:Seq. ID NO 13
- [0339] 来源:载脂蛋白 B 的片段
- [0340] 长度:20
- [0341] 类型:氨基酸肽
- [0342] 链:单链
- [0343] 拓扑:线性
- [0344] IALDDAKINFNEKLSQLQTY
- [0345] 序列:Seq. ID NO 14
- [0346] 来源:载脂蛋白 B 的片段
- [0347] 长度:20
- [0348] 类型:氨基酸肽
- [0349] 链:单链
- [0350] 拓扑:线性
- [0351] KTTKQSFDSLVSQAQYKKNKH
- [0352] 序列:Seq. ID NO 15
- [0353] 来源:载脂蛋白 B 的片段
- [0354] 长度:20
- [0355] 类型:氨基酸肽
- [0356] 链:单链
- [0357] 拓扑:线性
- [0358] EEEMLENSLVCPKDTRFK
- [0359] 序列:Seq. ID NO 16
- [0360] 来源:载脂蛋白 B 的片段

[0361] 长度 :20
[0362] 类型 :氨基酸肽
[0363] 链 :单链
[0364] 拓扑 :线性
[0365] GSTSHHLVSRKSISAALEHK
[0366] 序列 :Seq. ID NO 17
[0367] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0368] 长度 :20
[0369] 类型 :氨基酸肽
[0370] 链 :单链
[0371] 拓扑 :线性
[0372] IENIDFNKSGSSTASWIQNV
[0373] 序列 :Seq. ID NO 18
[0374] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0375] 长度 :20
[0376] 类型 :氨基酸肽
[0377] 链 :单链
[0378] 拓扑 :线性
[0379] IREVTQRLNGEIQALELPQK
[0380] 序列 :Seq. ID NO 19
[0381] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0382] 长度 :20
[0383] 类型 :氨基酸肽
[0384] 链 :单链
[0385] 拓扑 :线性
[0386] EVDVLTKYSQPEDSLIPFFE
[0387] 序列 :Seq. ID NO 20
[0388] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0389] 长度 :20
[0390] 类型 :氨基酸肽
[0391] 链 :单链
[0392] 拓扑 :线性
[0393] HTFLIYITELLKKLQSTTVM
[0394] 序列 :Seq. ID NO 21
[0395] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0396] 长度 :20
[0397] 类型 :氨基酸肽
[0398] 链 :单链
[0399] 拓扑 :线性

[0400] LLDIANYLMEQIQDDCTGDE
[0401] 序列:Seq. ID NO 22
[0402] 来源:载脂蛋白 B 的片段
[0403] 长度:20
[0404] 类型:氨基酸肽
[0405] 链:单链
[0406] 拓扑:线性
[0407] CTGDEDYTYKIKRVIGNMGQ
[0408] 序列:Seq. ID NO 23
[0409] 来源:载脂蛋白 B 的片段
[0410] 长度:20
[0411] 类型:氨基酸肽
[0412] 链:单链
[0413] 拓扑:线性
[0414] GNMGQTMEQLTPELKSSILK
[0415] 序列:Seq. ID NO 24
[0416] 来源:载脂蛋白 B 的片段
[0417] 长度:20
[0418] 类型:氨基酸肽
[0419] 链:单链
[0420] 拓扑:线性
[0421] SSILKCVQSTKPSLMIQKAA
[0422] 序列:Seq. ID NO 25
[0423] 来源:载脂蛋白 B 的片段
[0424] 长度:20
[0425] 类型:氨基酸肽
[0426] 链:单链
[0427] 拓扑:线性
[0428] IQKAAIQALRKMEPKDKDQE
[0429] 序列:Seq. ID NO 26
[0430] 来源:载脂蛋白 B 的片段
[0431] 长度:20
[0432] 类型:氨基酸肽
[0433] 链:单链
[0434] 拓扑:线性
[0435] RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ
[0436] 序列:Seq. ID NO 27
[0437] 来源:载脂蛋白 B 的片段
[0438] 长度:20

[0439] 类型 :氨基酸肽
[0440] 链 :单链
[0441] 拓扑 :线性
[0442] SLNSHGLELNADILGTDKIN
[0443] 序列 :Seq. ID NO 28
[0444] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0445] 长度 :20
[0446] 类型 :氨基酸肽
[0447] 链 :单链
[0448] 拓扑 :线性
[0449] WIQNVDTKYQIRIQIQEKLQ
[0450] 序列 :Seq. ID NO 29
[0451] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0452] 长度 :20
[0453] 类型 :氨基酸肽
[0454] 链 :单链
[0455] 拓扑 :线性
[0456] TYISDWWTAAKNLTDFAEQ
[0457] 序列 :Seq. ID NO 30
[0458] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0459] 长度 :20
[0460] 类型 :氨基酸肽
[0461] 链 :单链
[0462] 拓扑 :线性
[0463] EATLQRIYSLWEHSTKNHLQ
[0464] 序列 :Seq. ID NO 31
[0465] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0466] 长度 :20
[0467] 类型 :氨基酸肽
[0468] 链 :单链
[0469] 拓扑 :线性
[0470] ALLVPPETEEAKQVLFLDTV
[0471] 序列 :Seq. ID NO 32
[0472] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0473] 长度 :20
[0474] 类型 :氨基酸肽
[0475] 链 :单链
[0476] 拓扑 :线性
[0477] IEIGLEGKGFPTLEALFGK

[0478] 序列 :Seq. ID NO 33
[0479] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0480] 长度 :20
[0481] 类型 :氨基酸肽
[0482] 链 :单链
[0483] 拓扑 :线性
[0484] SGASMKLTTNGRFREHNAKF
[0485] 序列 :Seq. ID NO 34
[0486] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0487] 长度 :20
[0488] 类型 :氨基酸肽
[0489] 链 :单链
[0490] 拓扑 :线性
[0491] NLIGDFEVAEKINAFRAKVH
[0492] 序列 :Seq. ID NO 35
[0493] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0494] 长度 :20
[0495] 类型 :氨基酸肽
[0496] 链 :单链
[0497] 拓扑 :线性
[0498] GHSVLTAKGMALFGEGKAEF
[0499] 序列 :Seq. ID NO 36
[0500] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0501] 长度 :20
[0502] 类型 :氨基酸肽
[0503] 链 :单链
[0504] 拓扑 :线性
[0505] FKSSVITLNTNAELFNQSDI
[0506] 序列 :Seq. ID NO 37
[0507] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0508] 长度 :20
[0509] 类型 :氨基酸肽
[0510] 链 :单链
[0511] 拓扑 :线性
[0512] FPDLGQEVALNANTKNQKIR
[0513] 序列 :Seq. ID NO 38
[0514] 来源 :载脂蛋白 B 的片段
[0515] 长度 :20
[0516] 类型 :氨基酸肽

-
- [0517] 链 :单链
[0518] 拓扑 :线性
[0519] ATRFKHLRKYTYNYQAQSSS

经MDA修饰的肽1—100的IgG抗体

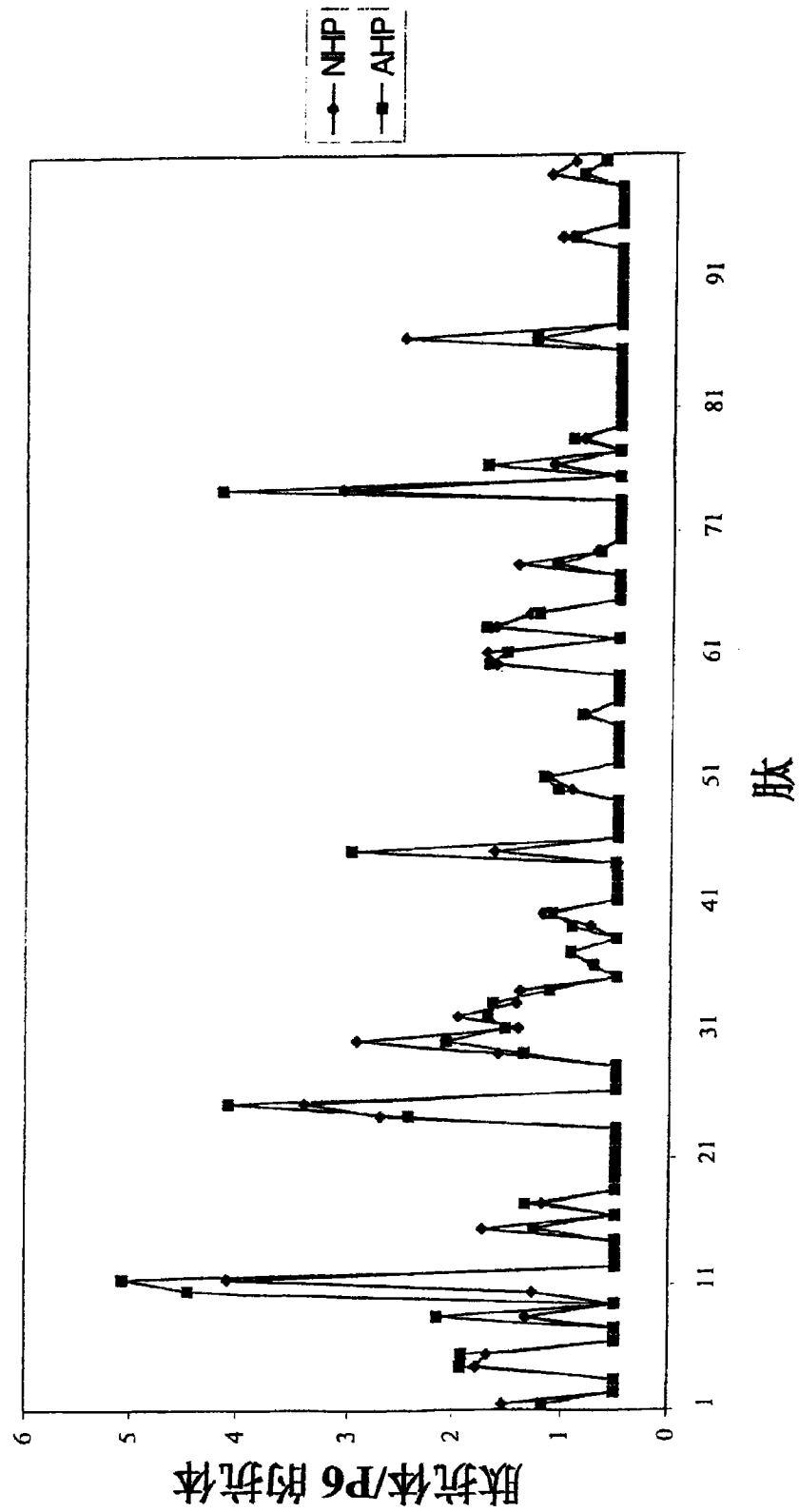


图 1

经MDA修饰的肽101—200的IgG抗体

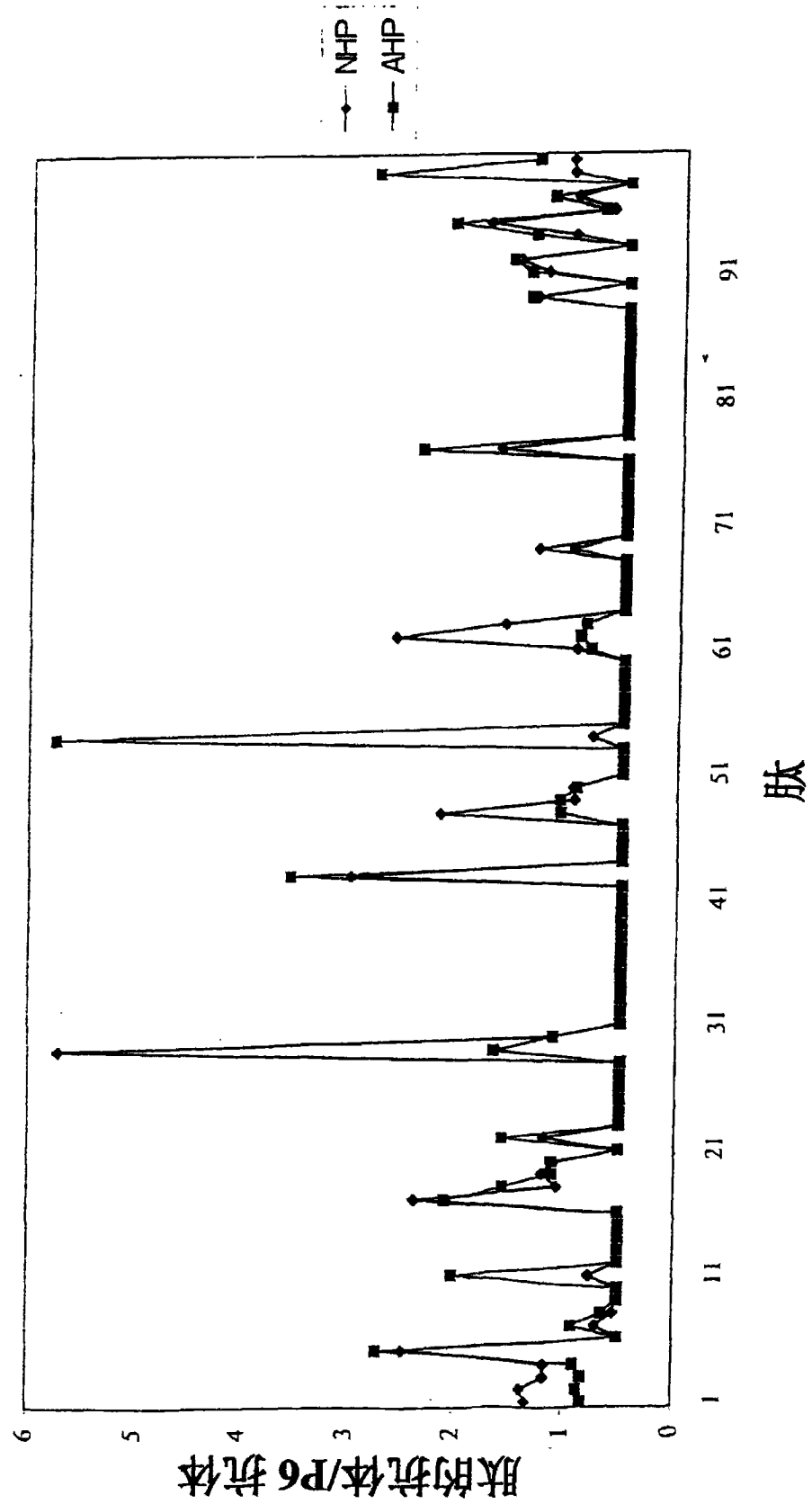


图 2

经MDA修饰的肽201—302的IgG抗体

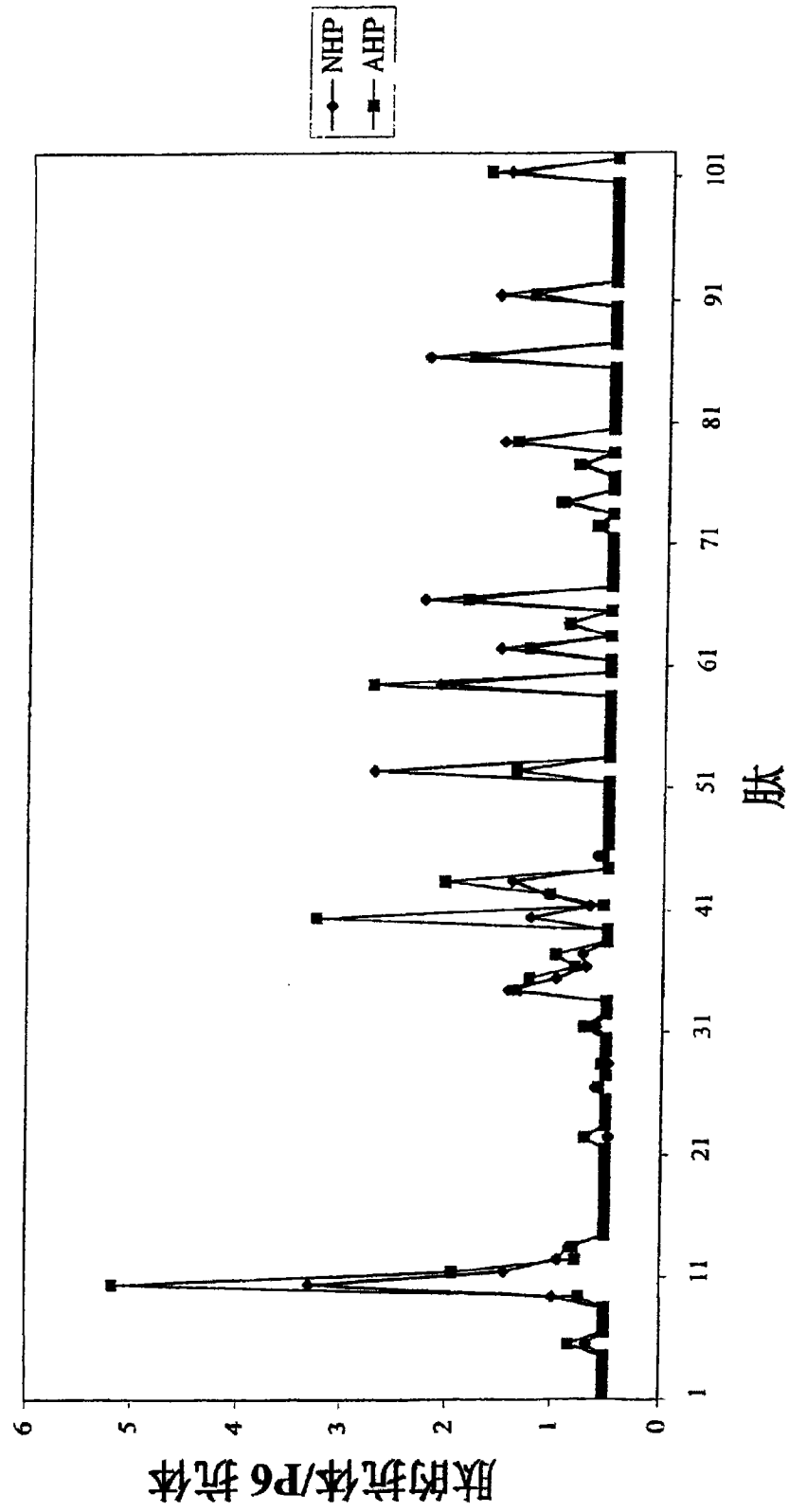


图 3

经MDA修饰的肽1—100的IgM抗体

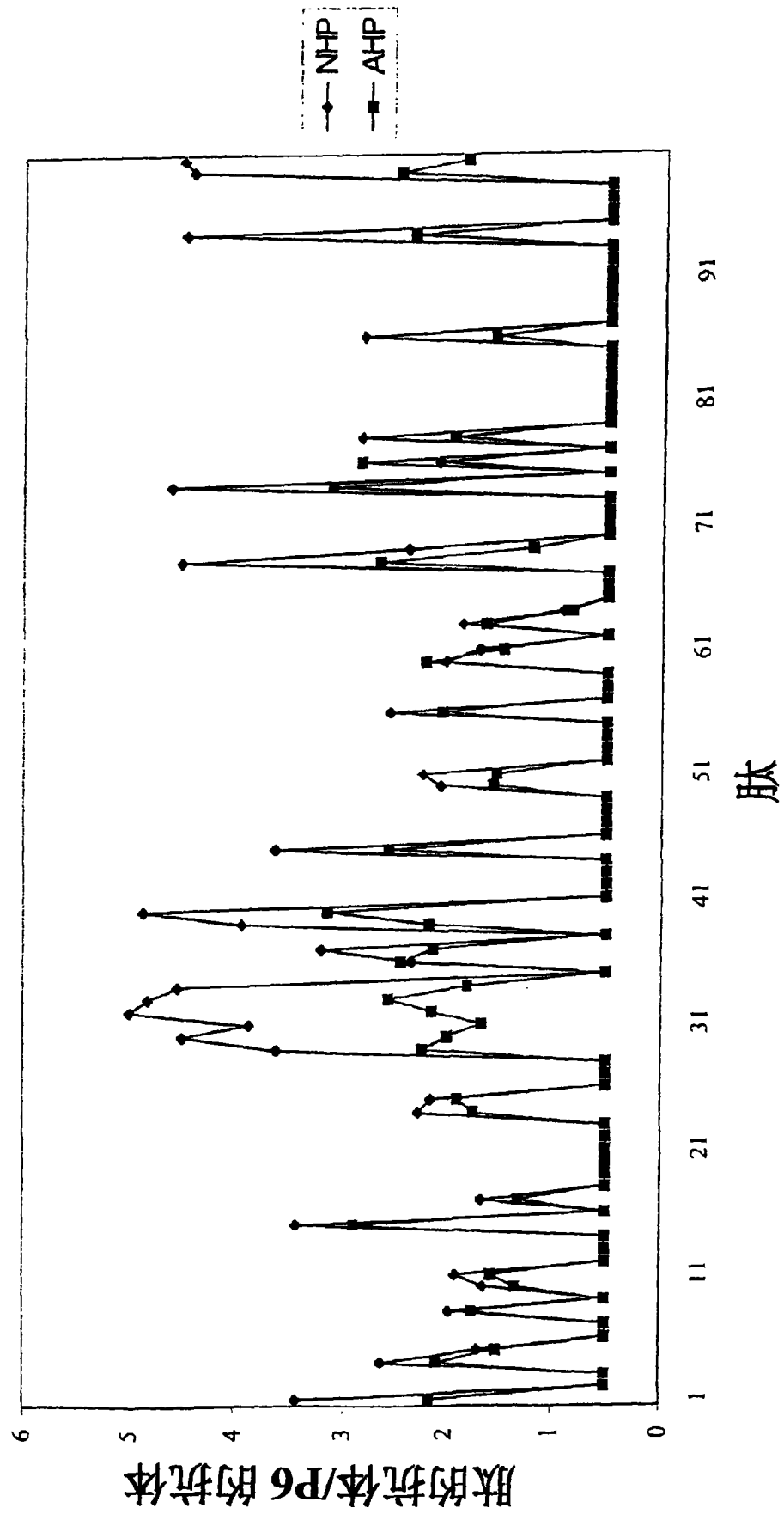


图 4

经MDA修饰的肽101—200的IgM抗体

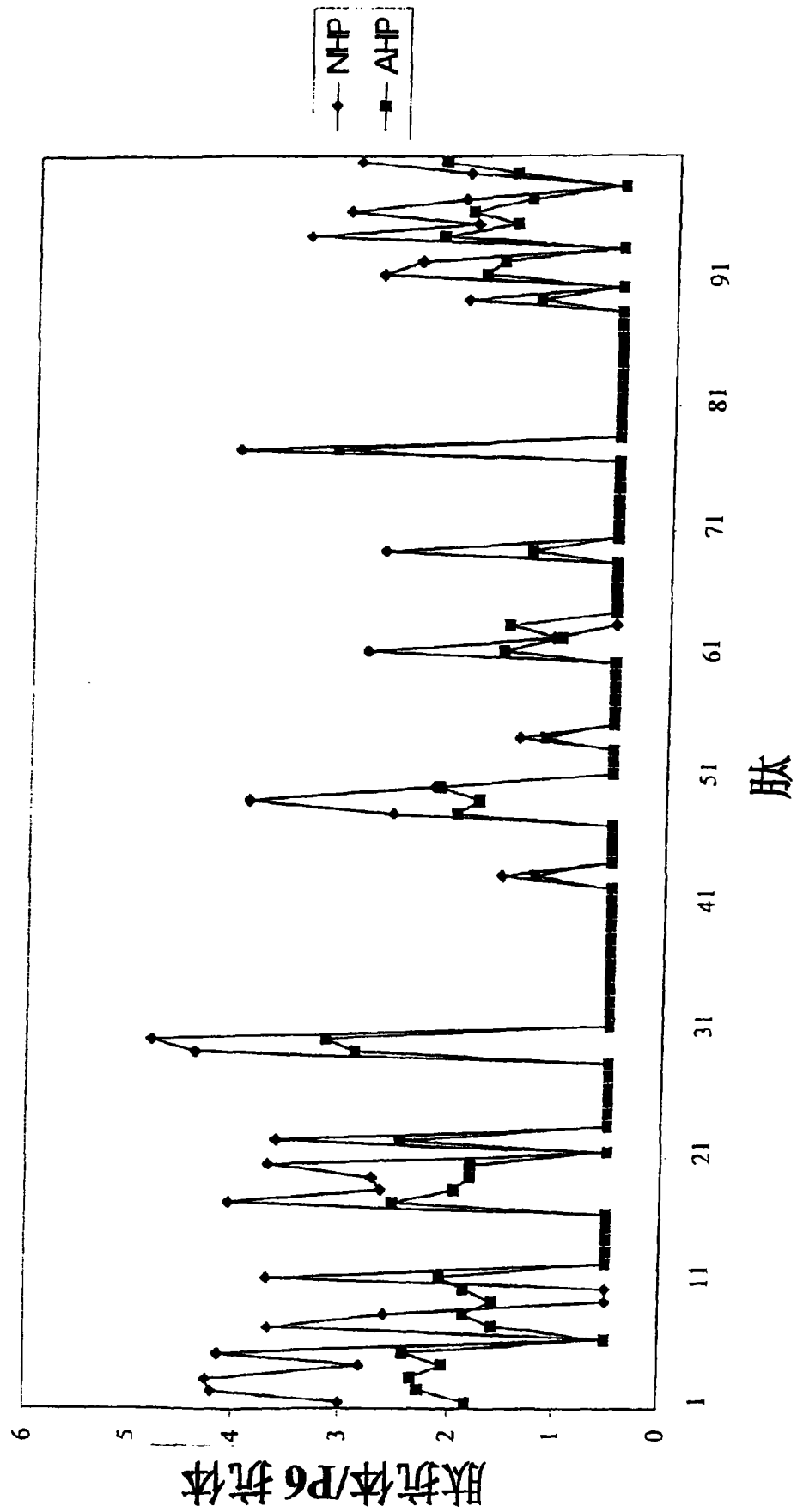


图 5

经 MDA 修饰的肽 201—302 的 IgM 抗体

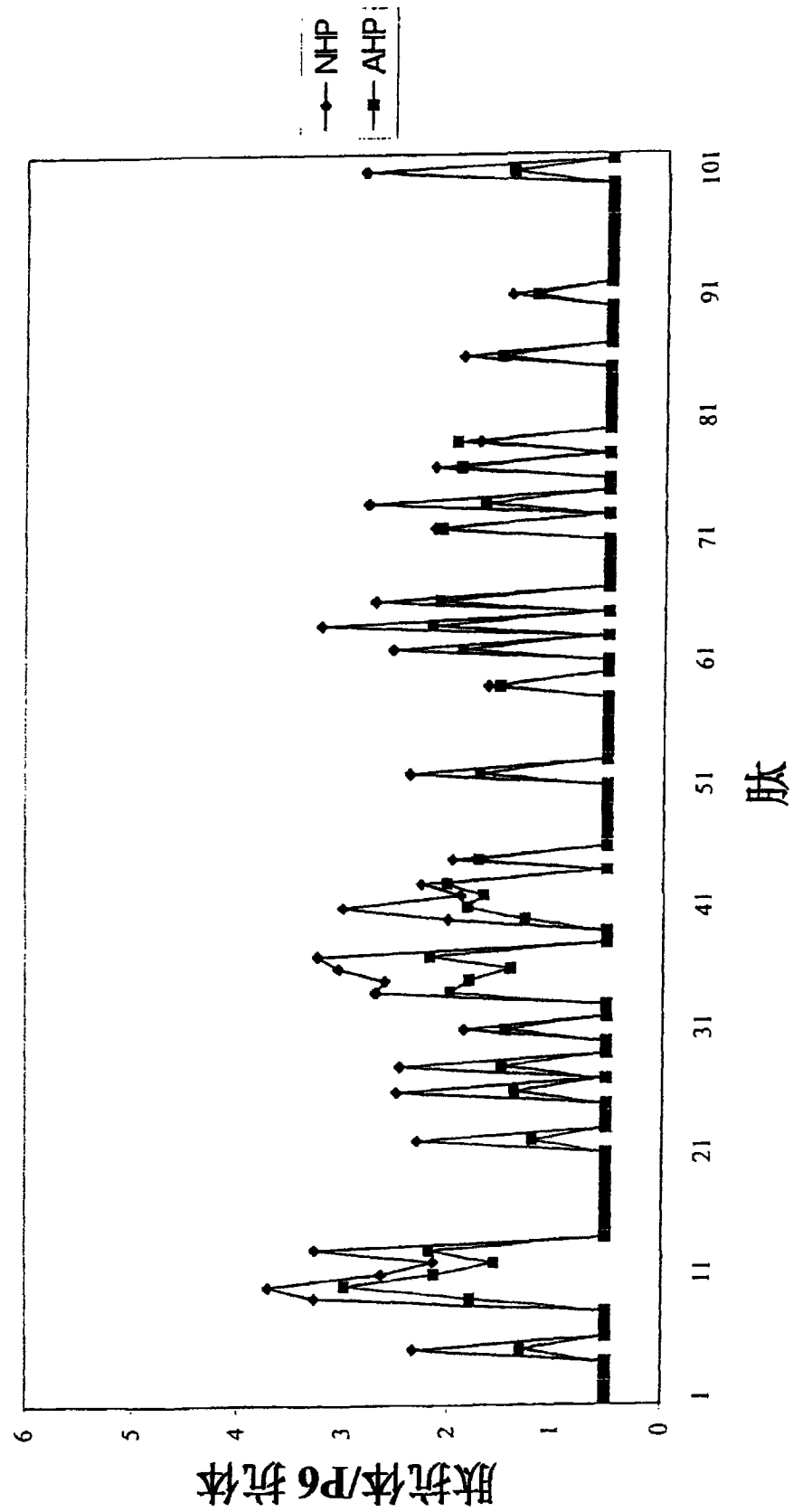


图 6

专利名称(译)	以肽为基础的治疗动脉粥样硬化的免疫疗法		
公开(公告)号	CN103122031A	公开(公告)日	2013-05-29
申请号	CN201210322795.9	申请日	2002-04-05
[标]申请(专利权)人(译)	南方佛斯卡专利公司 赛达斯西奈医疗中心		
申请(专利权)人(译)	南方佛斯卡专利公司 赛达斯西奈医疗中心		
当前申请(专利权)人(译)	南方佛斯卡专利公司 赛达斯西奈医疗中心		
[标]发明人	扬尼尔森 普里迪曼K沙赫		
发明人	扬·尼尔森 普里迪曼·K·沙赫		
IPC分类号	C07K16/18 A61K39/395 A61K39/00 A61P9/10 C07K7/08 G01N33/53 A61K A61K38/00 A61K38/17 A61K39/385 A61K39/39 C07K14/775		
CPC分类号	C07K16/18 C07K14/775 A61K38/1709 A61K39/00		
优先权	0103754 2001-11-09 SE 0101232 2001-04-05 SE		
其他公开文献	CN103122031B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及以肽为基础的治疗动脉粥样硬化的免疫疗法。本发明还涉及以肽为基础的用于确定针对氧化低密度脂蛋白的免疫反应的检测方法。本发明尤其涉及用于预防或治疗包括人类在内的哺乳动物中缺血性心血管疾病的载脂蛋白B的一个或多个片段的经纯化或重组产生的抗体，以及含有这些抗体的药物制剂。

经 MDA 修饰的肽 201—302 的 IgG 抗体

