(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-529143
(P2004-529143A)
(43)公表日　平成16年9月24日(2004.9.24)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C07K 14/775	C07K	14/775	ZNA	4C084
A61K 38/00	A61K	39/00	H	4C085
A61K 39/00	A61K	39/385		4H045
A61K 39/385	A61K	39/39		
A61K 39/39	A61K	39/395	D	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 92 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-578993(P2002-578993)
(86)(22)出願日　平成14年4月5日(2002.4.5)
(85)翻訳文提出日　平成15年10月6日(2003.10.6)
(86)国際出願番号　PCT/SE2002/000679
(87)国際公開番号　WO2002/080954
(87)国際公開日　平成14年10月17日(2002.10.17)
(31)優先権主張番号　0101232-7
(32)優先日　平成13年4月5日(2001.4.5)
(33)優先権主張国　スウェーデン(SE)
(31)優先権主張番号　0103754-8
(32)優先日　平成13年11月9日(2001.11.9)
(33)優先権主張国　スウェーデン(SE)

(71)出願人　502004928
フォルスカーパテント　イー　エスイーデー　アーベー
スウェーデン国、エス－２２３　７０　ルンド、イデオン（番地なし）
(71)出願人　398062149
セダーズ－シナイ　メディカル　センター
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９００４８，ロサンゼルス，ビバリー　ブールバード　８７００
(74)代理人　100081695
弁理士　小倉　正明
(72)発明者　ニルソン，ジャン
スウェーデン、エス－２４０　１３　ジェナープ、トペラドュガード　３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アテローム性動脈硬化症の治療のためのペプチドに基づいた免疫治療、及び酸化した低密度リポ蛋白質に対する免疫応答の測定のためのペプチドベースのアッセーの開発

(57)【要約】
本発明はアポリポタンパク質Ｂ断片、特に、虚血性心疾患に対する免疫源としてのまたは治療的な性質を有し、ＥＬＩＳＡ(酵素結合免疫吸着検定法（Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay）)の一またはそれ以上の前記ペプチドを使用して、虚血性心疾患の進展の危険の増加または減少に関する抗体の存在または不存在を分析するヒトを含む哺乳類の免疫感作または治療のための定義されたペプチドに関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトを含む哺乳類の免疫感作または治療のためのアポリポタンパク質Ｂ断片であって、虚血性心疾患に対する免疫源としてのまたは治療的な性質を有し、虚血性心疾患の進展の危険の増加または減少に関する抗体の存在または不存在を分析するアポリポタンパク質Ｂ断片。
【請求項２】
該断片がアルデヒドのハプテンである請求項１記載の断片。
【請求項３】
該断片がマロンデアルデヒドまたはヒドロキシノネナルを用いて変性されている請求項２記載の断片。
【請求項４】
下記の群からなる天然型またはアルデヒド誘導体である請求項１～３記載の断片であるペプチド。
ＦＬＤＴＶＹＧＮＣＳＴＨＦＴＶＫＴＲＫＧ
ＰＱＣＳＴＨＩＬＱＷＬＫＲＶＨＡＮＰＬＬ
ＶＩＳＩＰＲＬＱＡＥＡＲＳＥＩＬＡＨＷＳ
ＫＬＶＫＥＡＬＫＥＳＱＬＰＴＶＭＤＦＲＫＬＫＦＶＴＱＡＥＧＡＫＱＴＥＡＴＭＴＦＫ
ＤＧＳＬＲＨＫＦＬＤＳＮＩＫＦＳＨＶＥＫ
ＫＧＴＹＧＬＳＣＱＲＤＰＮＴＧＲＬＮＧＥ
ＲＬＮＧＥＳＮＬＲＦＮＳＳＹＬＱＧＴＮＱ
ＳＬＴＳＴＳＤＬＱＳＧＩＩＫＮＴＡＳＬＫ
ＴＡＳＬＫＹＥＮＹＥＬＴＬＫＳＤＴＮＧＫ
ＤＭＴＦＳＫＱＮＡＬＬＲＳＥＹＱＡＤＹＥ
ＭＫＶＫＩＩＲＴＩＤＱＭＱＮＳＥＬＱＷＰ
ＩＡＬＤＤＡＫＩＮＦＮＥＫＬＳＱＬＱＴＹ
ＫＴＴＫＱＳＦＤＬＳＶＫＡＱＹＫＫＮＫＨ
ＥＥＥＭＬＥＮＶＳＬＶＣＰＫＤＡＴＲＦＫ
ＧＳＴＳＨＨＬＶＳＲＫＳＩＳＡＡＬＥＨＫ
ＩＥＮＩＤＦＮＫＳＧＳＳＴＡＳＷＩＱＮＶ
ＩＲＥＶＴＱＲＬＮＧＥＩＱＡＬＥＬＰＱＫ
ＥＶＤＶＬＴＫＹＳＱＰＥＤＳＬＩＰＦＦＥ
ＨＴＦＬＩＹＩＴＥＬＬＫＫＬＱＳＴＴＶＭ
ＬＬＤＩＡＮＹＬＭＥＱＩＱＤＤＣＴＧＤＥ
ＣＴＧＤＥＤＹＴＹＫＩＫＲＶＩＧＮＭＧＱ
ＧＮＭＧＱＴＭＥＱＬＴＰＥＬＫＳＳＩＬＫ
ＳＳＩＬＫＣＶＱＳＴＫＰＳＬＭＩＱＫＡＡ
ＩＱＫＡＡＩＱＡＬＲＫＭＥＰＫＤＫＤＱＥ
ＲＬＮＧＥＳＮＬＲＦＮＳＳＹＬＱＧＴＮＱ
ＳＬＮＳＨＧＬＥＬＮＡＤＩＬＧＴＤＫＩＮ
ＷＩＱＮＶＤＴＫＹＱＩＲＩＱＩＱＥＫＬＱ
ＴＹＩＳＤＷＷＴＬＡＡＫＮＬＴＤＦＡＥＱ
ＥＡＴＬＱＲＩＹＳＬＷＥＨＳＴＫＮＨＬＱ
ＡＬＬＶＰＰＥＴＥＥＡＫＱＶＬＦＬＤＴＶ
ＩＥＩＧＬＥＧＫＧＦＥＰＴＬＥＡＬＦＧＫ
ＳＧＡＳＭＫＬＴＴＮＧＲＦＲＥＨＮＡＫＦ
ＮＬＩＧＤＦＥＶＡＥＫＩＮＡＦＲＡＫＶＨ
ＧＨＳＶＬＴＡＫＧＭＡＬＦＧＥＧＫＡＥＦ
ＦＫＳＳＶＩＴＬＮＴＮＡＥＬＦＮＱＳＤＩ
ＦＰＤＬＧＱＥＶＡＬＮＡＮＴＫＮＱＫＩＲ

ＡＴＲＦＫＨＬＲＫＹＴＹＮＹＱＡＱＳＳＳまたはこれらのペプチドの一またはそれ以上の活性部位。

【請求項５】

下記の群から選択される請求項３記載のペプチド。

ＨＴＦＬＩＹＩＴＥＬＬＫＫＬＱＳＴＴＶＭ

ＡＬＬＶＰＰＥＴＥＥＡＫＱＶＬＦＬＤＴＶ

ＦＬＤＴＶＹＧＮＣＳＴＨＦＴＶＫＴＲＫ

ＰＱＣＳＴＨＩＬＱＷＬＫＲＶＨＡＮＰＬＬ

ＬＬＤＩＡＮＹＬＭＥＱＩＱＤＤＣＴＧＤＥ

ＣＴＧＤＥＤＹＴＹＫＩＫＲＶＩＧＮＭＧＱ

ＧＮＭＧＱＴＭＥＱＬＴＰＥＬＫＳＳＩＬＫ

ＳＳＩＬＫＣＶＱＳＴＫＰＳＬＭＩＱＫＡＡ

ＩＱＫＡＡＩＱＡＬＲＫＭＥＰＫＤＫＤＱＥ

ＩＥＩＧＬＥＧＫＧＦＥＰＴＬＥＡＬＦＧＫ

ＶＩＳＩＰＲＬＱＡＥＡＲＳＥＩＬＡＨＷＳ

ＫＧＴＹＧＬＳＣＱＲＤＰＮＴＧＲＬＮＧＥ

ＲＬＮＧＥＳＮＬＲＦＮＳＳＹＬＱＧＴＮＱ

ＳＬＴＳＴＳＤＬＱＳＧｌＩＫＮＴＡＳＬＫ

ＴＡＳＬＫＹＥＮＹＥＬＴＬＫＳＤＴＮＧＫ

ＤＭＴＦＳＫＱＮＡＬＬＲＳＥＹＱＡＤＹＥ

ＧＳＴＳＨＨＬＶＳＲＫＳＩＳＡＡＬＥＨＫ　ＩＡ

ＬＤＤＡＫＩＮＦＮＥＫＬＳＱＬＱＴＹ

ＩＥＮＩＤＦＮＫＳＧＳＳＴＡＳＷＩＱＮＶ

ＮＬＧＤＦＥＶＡＥＫＩＮＡＦＲＡＫＶＨ　Ｉ

ＲＥＶＴＱＲＬＮＧＥＩＱＡＬＥＬＰＱＫ

ＧＨＳＶＬＴＡＫＧＭＡＬＦＧＥＧＫＡＥＦ

ＫＴＴＫＱＳＦＤＬＳＶＫＡＱＹＫＫＮＫＨ

ＦＰＤＬＧＱＥＶＡＬＮＡＮＴＫＮＱＫＩＲ

ＡＴＲＦＫＨＬＲＫＹＴＹＮＹＱＡＱＳＳＳまたはこれらのペプチドの１種類またはそれ以上の活性部位。

【請求項６】

天然型である請求項４または５記載のペプチド。

【請求項７】

酸化型である請求項４または５記載のペプチド。

【請求項８】

前記ペプチドが銅を用いて酸化されている請求項７記載のペプチド。

【請求項９】

前記ペプチドがリン脂質リポソームとの組み合わせで存在する請求項４または５記載のペプチド。

【請求項１０】

マロンデアルデヒド（ＭＤＡ）誘導体型である請求項４または５記載のペプチド。

【請求項１１】

ヒドロキシノネナル誘導体型である請求項４または５記載のペプチド。

【請求項１２】

所望によりアジュバントを組み合わせた、虚血性心疾患の治療のための免疫療法または治療法を目的とする医薬組成物の調製における、天然型またはＭＤＡもしくはヒドロキシノネナル誘導体型の請求項１～１１のいずれか１項に記載の１種類またはそれ以上の断片／ペプチドの使用。

【請求項１３】

免疫投与量が前記断片／ペプチド１～１００ｍｇである請求項１２記載の使用。

【請求項１４】
請求項１～１１のいずれか１項に記載の断片／ペプチドの１種類またはそれ以上の治療有効量を、所望により１種類またはそれ以上の薬理学的に無害の充填剤及び／または助剤との組み合わせで含有する医薬組成物。
【請求項１５】
前記断片／ペプチドがカチオン化ウシ血清アルブミンに結合して存在し、助剤として水酸化アルミニウムが使用される請求項１４記載の医薬組成物。
【請求項１６】
前記組成物が注射用組成物として存在する請求項１５記載の医薬組成物。
【請求項１７】
請求項１～１１のいずれか１項に記載の断片／ペプチドの１種類またはそれ以上を含む、虚血性心疾患に対するヒトを含むほ乳類の免疫感作のためのワクチン。
【請求項１８】
請求項１～１１のいずれか１項に記載の１種類又はそれ以上の前記天然型及び／またはＭＤＡ変性配列に対する精製されたまたは遺伝子組換えで生産された抗体の治療有効量を含む虚血性心疾患に対するヒトを含むほ乳類の免疫感作のためのワクチン。
【請求項１９】
前記免疫感作のための断片／ペプチドがカチオン化ウシ血清アルブミンに結合して存在し、助剤として水酸化アルミニウムが使用される請求項１７記載のワクチン。
【請求項２０】
天然型またはＭＤＡもしくはヒドロキシノネナル誘導体型の請求項１～１１のいずれか１項に記載の１種類またはそれ以上の断片及び／またはペプチドの治療有効量をアテローム性動脈硬化症に罹患した、または虚血性心疾患が進展する危険性に面したヒトを含むほ乳類に投与する、アテローム性動脈硬化症に罹患した、または虚血性心疾患が進展する危険性に面したヒトを含むほ乳類の予防的治療または治療方法。
【請求項２１】
天然型またはＭＤＡ変性配列に対する精製されたまたは遺伝子組換えで生産された抗体の治療有効量を投与して受動免疫を起こす、アテローム性動脈硬化症に罹患した、または虚血性心疾患が進展する危険性に面したヒトを含むほ乳類の予防的治療または治療方法。
【請求項２２】
病態が、高齢者における、酸化ＬＤＬが炎症、細胞毒性及びプラーク破壊の危険性に寄与していると考えられる不安定なアテロームプラーク、並びに冠動脈心疾患の１またはそれ以上である請求項２０記載の方法。
【請求項２３】
アッセーにおいて一またはそれ以上の請求項１～１１のいずれか１項に記載の断片及び／またはペプチドを用いる、虚血性心疾患の進展の危険の増加または減少に関連する抗体の存在または不存在を診断する方法。
【請求項２４】
前記アッセーがイムノアッセーである請求項２３記載の方法。
【請求項２５】
前記イムノアッセーがＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、ウェスタンブロッティング、サザンブロッティングである請求項２４記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、新規ペプチド、特にアテローム性動脈硬化症の治療のための免疫治療に使用されるペプチド、及び酸化低密度リポ蛋白質に対する免疫応答の測定の及びアテローム性動脈硬化症の存在または不存在の診断のためのペプチドベースのＥＬＩＳＡの開発に関する。
【０００２】

特に、本発明は下記のものを含む：
１）　表１に列挙した、天然型または変性したペプチドを単独でまたは組み合わせて、好ましくは適当な担体及び助剤と共に、虚血性の予防及び治療用のための免疫療法としてまたは抗アテローム性動脈硬化症「ワクチン」として使用すること
２）心疾患
３）　虚血性心疾患の進展の危険の増加または減少に関する抗体の検出用のＥＬＩＳＡにおける該ペプチドの使用。
【背景技術】
【０００３】
アテローム性動脈硬化症は大動脈または中動脈の最も内側の層（内膜）の肥厚を引き起こす慢性病である。これは血流を減少させ、罹患した血管によって供給される器官中の虚血及び組織破壊を引き起こしうる。アテローム性動脈硬化症は心筋梗塞、脳卒中及び周辺の動脈疾患を含む心疾患の主な原因である。それは西欧諸国における主な死因であり、２０年以内に全世界の主要な死因になることが予測される。
【０００４】
この疾病は、主に低密度リポ蛋白質（ＬＤＬ）であるリポタンパク質の血管の細胞外マトリックスへの蓄積によって始まる。これらのＬＤＬ粒子は凝集し、酸化的変性を進行させる。酸化ＬＤＬは毒性であり、血管損傷を引き起こす。アテローム性動脈硬化症は、多くの点で炎症と繊維化を含むこの傷に対する反応を表す。
【０００５】
１９８９年には、パリンスキ（Palinski）及びその同僚が、ヒトにおける酸化ＬＤＬに対する循環する自己抗体を確認した。この観察により、アテローム性動脈硬化症が酸化したリポタンパク質に対する免疫応答によって引き起こされる自己免疫疾患であることが提案された。この時に、いくつかの研究所は、酸化ＬＤＬに対する抗体価と心疾患との関係を探索し始めた。しかしながら、これらの研究から出現した臨床像は明白と言うにはほど遠いものであった。酸化ＬＤＬの多くの異なるエピトープに対する抗体は存在していたが、これらのエピトープの構造は未知であった。従って、「酸化ＬＤＬ抗体」の語は、１つの特異抗体よりはむしろ、異なる抗体の未知の混合物を意味するものであった。Ｔ細胞に依存しないＩｇＭ抗体は、Ｔ細胞に依存するＩｇＧ抗体より頻度が高かった。
【０００６】
酸化ＬＤＬに対する抗体は、心疾患を有する患者にも、健全なコントロールにも存在した。いくつかの初期の研究には酸化ＬＤＬ抗体価と心疾患との関連を報告したものもあるが、そのような関連を見いだせないものもあった。これらの研究の主な弱点は、抗体価の測定に使用されるＥＬＩＳＡ試験がリガンドとして酸化ＬＤＬ粒子を使用していたことである。ＬＤＬの組成は個体が異なれば異なり、酸化の変性の程度は制御するのも評価するのも困難であり、酸化ＬＤＬ粒子中の異なるエピトープに対する抗体のレベルを測定することはできない。ある程度までは技術的な問題により、それまでのところ利用可能な技術を使用して、酸化ＬＤＬに対する抗体反応の役割を評価することは困難であった。しかしながら、完全な酸化ＬＤＬ粒子を使用する場合、よく定義され複製可能なワクチンのコンポーネントを作成することは可能ではなかった。
【０００７】
血管壁の酸化ＬＤＬに対する自己免疫応答がアテローム性動脈硬化症の進展に重要な役割を果たす可能性を調査する別の方法は、それ自身の酸化ＬＤＬに対して動物を免疫感作することである。このアプローチの背後にある考えは、酸化ＬＤＬに対する自己免疫応答が古典的免疫技術を用いて強化されると、血管炎症の増加及びアテローム性動脈硬化症の進行をもたらすことである。この仮説をテストするために、ウサギを同族の酸化ＬＤＬで免疫し、次に、３か月間、この動物に高コレステロール食を与えて、アテローム性動脈硬化症を引き起こした。
【０００８】
しかしながら、もとの仮説とは対照的に、酸化ＬＤＬによる免疫感作は、アテローム性動

脈硬化症を約５０％縮小する保護効果を有していた。より積極的なプラークの進展を生じさせる血管バルーンインジュリーと高コレステロール食を組み合わせた後続の研究でも、同様の結果が得られた。我々の研究と平行して、他のいくつかの研究所は同様の観察を報告した。利用可能なデータをともに採用すると、アテローム性動脈硬化症の進展に対して保護を行う、酸化ＬＤＬに対する自己免疫を含む免疫応答が存在することが明白に実証された。

【０００９】

これらの観察は、さらに人におけるアテローム性動脈硬化症をベースとする心疾患の治療のための免疫治療あるいは「ワクチン」の開発の可能性を示唆する。これを行う１つのアプローチは、個体を、自己のＬＤＬで、例えば銅により酸化した後、免疫感作することであろう。しかしながら、このアプローチは、酸化ＬＤＬにおけるどの構造が防御免疫を引き起こす原因であるか、また酸化ＬＤＬがさらに逆の免疫応答を生じさせるエピトープを含んでいるかどうかが知られていないという事実によって複雑になる。

【００１０】

酸化ＬＤＬ中のエピトープの同定は、いくつかの観点から重要である：

まず、これらのエピトープのうちの１つあるいはいくつかのものは、酸化ＬＤＬで免疫感作した動物中で観察される抗アテローム発生免疫応答を活性化する原因となると考えられる。従って、これらのエピトープを含むペプチドは、ヒトの免疫治療あるいは「アテローム性動脈硬化症ワクチン」の開発の可能性を表わすかもしれない。さらに、それらは、ヒトにおいて進展したアテローム性動脈硬化症の治療のために使用することができる。

【００１１】

第２に、同定されたエピトープを含むペプチドは、酸化ＬＤＬの特定の構造に対する抗体を検出することができるＥＬＩＳＡを開発するために使用することができる。そのようなＥＬＩＳＡは、現在利用可能な、抗原として酸化ＬＤＬ粒子を使用するものより正確で且つ信頼できるであろう。さらに、それは、心疾患に関連した、酸化ＬＤＬの中の異なるエピトープに対する免疫応答の分析を可能にするであろう。

【００１２】

米国特許５，９７２，８９０は、アテローム性動脈硬化症を分析するためのペプチドの使用に関する。該米国特許に示されている技術は、原理として放射物理学的診断の形式である。ペプチド配列は放射能で標識され、血流に注射される。このペプチド配列がアポリポタンパクＢの中にある配列と同一である場合は、アポリポタンパクＢについて存在しているレセプターが存在する組織に結合するであろう。血管では、これは上記全てのアテローム性動脈硬化のプラークである。その後、血管壁の放射能の濃度は、例えば、ガンマカメラによって測定することができる。従って、この技術は、放射標識されたペプチド配列がアテローム性動脈硬化のプラークに存在する正常な組織レセプターに結合するであろうという事実に基づいた放射物理学的方法であり、これは外部放射能分析を使用して検出される。これは、アテローム性動脈硬化のプラークを識別する直接分析方法である。それは、患者に放射性化合物が投与されることを必要とする。

【００１３】

本発明の技術は全く異なる法則及び方法に基づく。請求項１によると、本発明は、アポリポタンパクＢのペプチド配列に対する免疫反応を分析する方法、並びに心疾患に対する免疫用のアポリポタンパクＢの断片に関する。そのような免疫反応は、進展したアテローム性動脈硬化症の個体中で増加していることが示された。本発明の技術は、ポリマーウェルの底にペプチド配列を結合させることに基づく。血液サンプルが添加されると、該ペプチドはこれらの配列に特異的な抗体を結合させるであろう。その後、結合した抗体の量を免疫学的方法／技術を用いて調べる。従って、前記米国特許の技術とは対照的に、これは、アテローム性動脈硬化のプラークを識別し局在化させる直接の測定方法でなく、アテローム性動脈硬化症の進展の高度な共変を示す免疫学的応答を調べるものである。

【００１４】

このように、本発明の基本原理は、前述の特許のものとは全く異なる。後者が、アテロー

ム性動脈硬化の組織の中にあるリポタンパク質の正常なレセプターへのペプチド配列の結合に依存するのに対し、前者は、ペプチド配列に対する免疫反応の検出及びこれらのペプチド配列の抗体の測定に基づいている。

【００１５】

公表された研究（パリンスキ他（Palinski et al）、１９９５年、そしてジョージ他（George et al）、１９９８）により、酸化ＬＤＬに対する免疫感作により、アテローム性動脈硬化症の進展が縮小されることを示された。これは、一般に酸化ＬＤＬに対する免疫反応が保護する効果があることを示すであろう。しかしながら、ここに与えられた結果は、驚くべきことに、これが必ずしもそうとは限らないことを示した。例えば、ペプチド＃１０、４５、１５４、１９９及び２４０の混合物を用いた免疫感作は、アテローム性動脈硬化症の進展を増加させた。他のペプチド配列、例えばペプチド配列＃１、及び３０～３４を用いた免疫感作は、アテローム性動脈硬化症の進展に対する総合的な効果を欠いている。これらの結果は驚くべきである。その酸化ＬＤＬに対する免疫反応は、酸化ＬＤＬの中のどの構造に向けられるかに依存して、アテローム性動脈硬化症の進展を保護し、該進展に寄与し、または全く効果を奏しないからである。これらの発見は、免疫反応を保護することを活性化することを分離した免疫方法を開発することを可能にする。さらに、それらは、使用される粒子がアテローム発生の免疫反応を生じさせる構造を高レベルで含んでいる場合、完全な酸化ＬＤＬを使用する免疫感作が不利益な効果を奏するかもしれないことを示す。

【００１６】

ＷＯ　９９／０８１０９は、血清と血漿中の酸化ＬＤＬの存在を測定するための、酸化ＬＤＬの粒子に結合するマウスのモノクローナル抗体のパネルの使用に関する。従って、これは、酸化ＬＤＬに対する抗体を測定する方法が示されている本発明とは全く異なる。

【００１７】

米国特許４，９７０，１４４号は、ペプチド配列を用いた免疫感作によって抗体を調製する方法に関し、該抗体は、ＥＬＩＳＡを使用したアポリポタンパクの測定のために使用することができる。従って、これはこのように本発明と全く異なるものである。

【００１８】

米国特許５，８６１，２７６号はアポリポタンパクの正常型の組換え抗体を記載する。この抗体は、血漿及び血清中の正常なアポリポタンパクＢの存在を調べ、循環中の正常なＬＤＬの粒子の量を低下させることにより、アテローム性動脈硬化症を治療するために使用される。

【００１９】

本発明において、抗体の使用は、アテローム性動脈硬化症の治療のために記述されている。しかしながら、米国特許５，８６１，２７６号とは異なり、これらの抗体は、ＬＤＬの正常な粒子ではなく酸化ＬＤＬの粒子中に存在する構造を指向する。その効果は、それがアテローム性動脈硬化症の進展を生じさせると予測される酸化ＬＤＬであるということである。酸化ＬＤＬに特有の構造を指向する抗体の使用は、該米国特許には記載されていない。

【００２０】

発明の要約

血管壁におけるリポタンパク質、主としてＬＤＬの酸化は、アテローム性動脈硬化症の進展において重要な要素であると考えられる。ＬＤＬの酸化中に生じた生成物は、血管細胞にとって有毒であり、炎症を引き起こし、プラーク形成を開始する。酸化ＬＤＬ中のエピトープは免疫系によって認識され、抗体産生を生じさせる。動物実験により、これらの免疫応答のうちのいくつかがアテローム性動脈硬化症に対する保護効果を持っていることが示された。抗体は、通常、ペプチドに基づいた構造をほとんど排他的に指向する。ＬＤＬ、アポリポタンパクＢ中に存在する唯一の蛋白質の完全な配列をカバーするポリペプチドライブラリーを使用して、ヒトにおいて抗体産生を生じさせる酸化ＬＤＬ中のエピトープが同定された。これらのペプチドエピトープは酸化ＬＤＬと心疾患に対する免疫応答の関

連を研究し、かつ虚血性心疾患の予防及び治療のための免疫療法または抗アテローム性動脈硬化症「ワクチン」を開発するためのＥＬＩＳＡを開発するために使用することができる。

【００２１】

発明の詳細な説明

酸化ＬＤＬ中のエピトープの分子特性は、ヒトにおいて抗体依存性の免疫応答を生じさることが実証された。使用されたアプローチは、免疫応答が５－６のアミノ酸長のペプチド配列を殆ど排他的に指向するという事実の利点を利用する。ＬＤＬは唯一の蛋白質、４５６３アミノ酸長のアポリポタンパクＢのみを含む。酸化の間、アポリポタンパクＢは断片化され、アルデヒド付加物が正に帯電したアミノ酸、特にリジンに結合する。これは、アポリポタンパクＢの三次元構造のために通常は露出していないペプチド配列が免疫細胞にアクセス可能になるか、及び／またはその通常露出しているペプチド配列がアルデヒドとのハプテン化により免疫原性となることを意味する。

【００２２】

これにより、下記のペプチド、天然型またはＭＤＡ誘導体が、免疫反応を生じるような効果を有することが調べられた。これらのペプチドは：

ＦＬＤＴＶＹＧＮＣＳＴＨＦＴＶＫＴＲＫＧ
ＰＱＣＳＴＨＩＬＱＷＬＫＲＶＨＡＮＰＬＬ
ＶＩＳＩＰＲＬＱＡＥＡＲＳＥＩＬＡＨＷＳ
ＫＬＶＫＥＡＬＫＥＳＱＬＰＴＶＭＤＦＲＫ
ＬＫＦＶＴＱＡＥＧＡＫＱＴＥＡＴＭＴＦＫ
ＤＧＳＬＲＨＫＦＬＤＳＮＩＫＦＳＨＶＥＫ
ＫＧＴＹＧＬＳＣＱＲＤＰＮＴＧＲＬＮＧＥ
ＲＬＮＧＥＳＮＬＲＦＮＳＳＹＬＱＧＴＮＱ
ＳＬＴＳＴＳＤＬＱＳＧＩＩＫＮＴＡＳＬＫ
ＴＡＳＬＫＹＥＮＹＥＬＴＬＫＳＤＴＮＧＫ
ＤＭＴＦＳＫＱＮＡＬＬＲＳＥＹＱＡＤＹＥ
ＭＫＶＫＩＩＲＴＩＤＱＭＱＮＳＥＬＱＷＰ
ＩＡＬＤＤＡＫＩＮＦＮＥＫＬＳＱＬＱＴＹ
ＫＴＴＫＱＳＦＤＬＳＶＫＡＱＹＫＫＮＫＨ
ＥＥＥＭＬＥＮＶＳＬＶＣＰＫＤＡＴＲＦＫ
ＧＳＴＳＨＨＬＶＳＲＫＳＩＳＡＡＬＥＨＫ
ＩＥＮＩＤＦＮＫＳＧＳＳＴＡＳＷＩＱＮＶ
ＩＲＥＶＴＱＲＬＮＧＥＩＱＡＬＥＬＰＱＫ
ＥＶＤＶＬＴＫＹＳＱＰＥＤＳＬＩＰＦＦＥ
ＨＴＦＬＩＹＩＴＥＬＬＫＫＬＱＳＴＴＶＭ
ＬＬＤＩＡＮＹＬＭＥＱＩＱＤＤＣＴＧＤＥ
ＣＴＧＤＥＤＹＴＹＫＩＫＲＶＩＧＮＭＧＱ
ＧＮＭＧＱＴＭＥＱＬＴＰＥＬＫＳＳＩＬＫ
ＳＳＩＬＫＣＶＱＳＴＫＰＳＬＭＩＱＫＡＡ
ＩＱＫＡＡＩＱＡＬＲＫＭＥＰＫＤＫＤＱＥ
ＲＬＮＧＥＳＮＬＲＦＮＳＳＹＬＱＧＴＮＱ
ＳＬＮＳＨＧＬＥＬＮＡＤＩＬＧＴＤＫＩＮ
ＷＩＱＮＶＤＴＫＹＱＩＲＩＱＩＱＥＫＬＱ
ＴＹＩＳＤＷＷＴＬＡＡＫＮＬＴＤＦＡＥＱ
ＥＡＴＬＱＲＩＹＳＬＷＥＨＳＴＫＮＨＬＱ
ＡＬＬＶＰＰＥＴＥＥＡＫＱＶＬＦＬＤＴＶ
ＩＥＩＧＬＥＧＫＧＦＥＰＴＬＥＡＬＦＧＫ
ＳＧＡＳＭＫＬＴＴＮＧＲＦＲＥＨＮＡＫＦ
ＮＬＩＧＤＦＥＶＡＥＫＩＮＡＦＲＡＫＶＨ

ＧＨＳＶＬＴＡＫＧＭＡＬＦＧＥＧＫＡＥＦ
ＦＫＳＳＶＩＴＬＮＴＮＡＥＬＦＮＱＳＤＩ
ＦＰＤＬＧＱＥＶＡＬＮＡＮＴＫＮＱＫＩＲ，　並びに非抗体産生ペプチド
ＡＴＲＦＫＨＬＲＫＹＴＹＮＹＱＡＱＳＳＳ
またはこれらのペプチドの一またはそれ以上の活性部位である。

【００２３】

材料及び方法

ＬＤＬ酸化の結果免疫原性になるアポリポプロテインＢの部分を調べるために、ヒトアポリポプロテインＢの全配列をカバーする２０アミノ酸の長さのペプチドからなるポリペプチドライブラリーを形成した。これらのペプチドは、全ての配列をカバーするために破断点で５アミノ酸の重複を有するように製造した。ペプチドは、そのままの状態で、またはリン脂質リポソーム挿入した後、銅に接触させて酸化した後またはＬＤＬ酸化中に生じ得るアミノ酸の異なる変性を模したマロンデアルデヒド（ＭＤＡ）変性の後に使用した。

【００２４】

ペプチド

ヒトアポリポプロテインＢの全アミノ酸配列に相当する３０２ペプチドを合成し（ユーロ－ダイアグノスティカ　アクチボラゲット（Euro-Diagnostica AB）、マルモ（Malmo）、スウェーデン及びケイアイ　ロス　ペターソン　エイエス（KI Ross Petersen AS）、ホーホルム（Horholm）、デンマーク）、ＥＬＩＳＡで使用した。各合成ペプチドのフラクションを、０．５ＭのＭＤＡ（シグマ－アルドリッチ　スウェーデン　アクチボラゲット（Sigma-Aldrich Sweden AB）、ストックホルム、スウェーデン）で３７℃で３時間、そしてリポソームの存在下で、０．５ＭのＭＤＡにより３７℃で３時間または５μＭの$CuCl_2$（シグマ）により３７℃で１８時間変性させた。ＭＤＡで変性させたペプチドはいくつかの変更をした１ｍＭのＥＤＴＡを含むＰＢＳで、４℃で１８時間透析した。これらのペプチドの変性を、ペプチドの分離に適する変性ポリアクリルアミドゲル（バイオ－ラッド　ラボラトリーズ（Bio-Rad Laboratories）、ハーキュリーズ（Hercules）、カリフォルニア（CA））で試験した。ペプチドは、該タンパク質のＮ末端から出発して、１－３０２の番号を付された。

【００２５】

他のアルデヒドをヒドロキシノネナル等の誘導体の製造に使用することもできる。

【００２６】

リポソーム

クロロホルム中、モル比９：１の卵ホスファチジルコリン（ＥＰＣ）（シグマ）及びホスファチジルセリン（ＰＳ）（シグマ）と３ｍＭ濃度のリン脂質（ＰＬ）の混合物を、ガラス容器中、緩やかなアルゴン流の下で蒸発させた。その後、該容器を３時間真空下に置いた。滅菌濾過した１０ｍＭのＨＥＰＥＳ緩衝液ｐＨ７．４中、０．１０ｍＭペプチド（５ｍｌ）、１４５ｍＭのＮａＣｌ及び０．００３％のアジ化ナトリウムを含有する溶液をＥＰＣ／ＰＳ乾燥フィルムに添加し、５０℃で１５分間インキュベートした。この混合物を室温で約５分間穏やかにボルテックスミキサーで混合し、その後、氷冷浴中に入れ、１分間の間隙をおいて７．５アンプリチュードミクロンで３分間で３回超音波処理した（ソニープレップ（Sonyprep）１５０　ＭＳＥ　サンヨー（Sanyo）、タムロ－メドラブ（Tamro-Medlab）、スウェーデン）。天然のまたは０．５ＭのＭＤＡにより３７℃で３時間もしくは５ｍＭの$CuCl_2$により３７℃で１８時間変性したＰＬペプチド混合物を、アルミホイルで封をしたガラスバイアルに４℃、アルゴン下で保存し、１週間以内に使用した。このＭＤＡ変性混合物を、貯蔵前に、いくつかの変化を加えた１ｍＭのＥＤＴＡを含有するＰＢＳで、４℃で１８時間透析した。該混合物の変性を、ペプチドの分離に適する変性ポリアクリルアミドゲル（バイオ－ラッド　ラボラトリーズ　エイエス（Bio-Rad Laboratories AB）、サンドバイバーグ（Sundbyberg）、スウェーデン）で試験した。

【００２７】

血漿サンプル

心疾患の患者（ＡＨＰ）１０人及び健常な血液ドナー（ＮＨＰ）５０人（女性２５人、男性２５人）からの血漿サンプルを集めプールした。二つのプールを分割し、－８０℃で貯蔵した。

【００２８】

ＥＬＩＳＡ

リポソームの存在下または不存在下でＰＢＳ，ｐＨ７．４（２０μｇ／ｍｌ）で希釈した天然のまたは変性した合成ペプチドを、マイクロタイタープレートウェル（ヌンク　マキシソープ（Nunc Maxisorp）、ヌンク（Nunc）、ロスキルド（Roskilde）、デンマーク）に吸着させ、４℃で一晩インキュベートした。参考用として、ペプチドの一つ（Ｐ６）を、各プレートに流した。０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を含有するＰＢＳ（ＰＢＳ－Ｔ）で洗浄した後、コーティングされたプレートを、ＴＢＳ中のスーパーブロック（SuperBlock）（ピアース（Pierce）、ロックフォード（Rockford）、イリノイ（IL））で室温で５分間ブロックし、続いて、ＴＢＳ－０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０（ＴＢＳ－Ｔ）で希釈されたプールされたヒト血漿、ＡＨＰまたはＮＨＰを室温で２時間、その後４℃で一晩インキュベートした。すすいだ後、該ペプチドに対する自己抗体の付着を、ＴＢＳ－Ｔで適当に希釈したビオチニル化ウサギ抗ヒトＩｇＧまたはＩｇＭ抗体（ダコ　エイ／エス（DakoA/S）、グロストラップ（Glostrup）、デンマーク）を用いることにより検出した。さらに室温で２時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、結合したビオチニル化抗体をアルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジン（シグマ）で検出し、室温で２時間インキュベートした。着色反応を、ホスファターゼ基質キット（ピアース）を用いて展開し、室温で１時間インキュベートした後、４０５ｎｍの吸収を測定した。異なるペプチドの吸収値をＰ６の吸収値で分け、比較した。

【００２９】

アポリポプロテインＢの配列は、添付図面の配列番号１～３７に示されている。ＡＨＰ及びＮＨＰのいずれも、大量の異なるペプチドに対する抗体を含んでいた。天然及び変性ペプチドの両方に対する抗体が同定された。通常、ＭＤＡ変性ペプチドに対する抗体力価は、対応する天然型ペプチドのものより高いか等しい。天然型、ＭＤＡ変性、銅酸化ペプチドを比較すると、高い相関度を示し、ＭＤＡ変性ペプチドを用いた場合にもっとも高い抗体力価が検出された。リポソームに組み込まれたペプチドを使用すると、抗体レベルは増加しなかった。ＩｇＭサブクラスの抗体は、ＩｇＧサブタイプの抗体に比べてはるかに一般的である。

【００３０】

最も高い抗体レベルが検出されたペプチドは、一般的な特性により６グループに分けることができた（表１）：

（Ａ）ＭＤＡ変性ペプチドに対する高レベルのＩｇＧ抗体（ｎ＝３）

（Ｂ）高レベルのＩｇＭ抗体であるが、天然型及びＭＤＡ変性ペプチドに差はなかった（ｎ＝９）

（Ｃ）高レベルのＩｇＧ抗体であるが、天然型及びＭＤＡ変性ペプチドに差はなかった（ｎ＝２）

（Ｄ）ＭＤＡ変性ペプチドに対する高レベルのＩｇＧ抗体、ＡＨＰ－プールに比べて、ＮＨＰ－プールにおいて少なくとも２倍高い（ｎ＝５）

（Ｅ）ＭＤＡ変性ペプチドに対する高いレベルのＩｇＭ抗体、ＡＨＰ－プールに比べて、ＮＨＰ－プールにおいて少なくとも２倍高い（ｎ＝１１）

（Ｆ）高レベルのＩｇＧ抗体であるが、無傷の及びＭＤＡ変性ペプチドの差はなく、ＡＨＰプール中の抗体はＮＨＰプールと比較して少なくとも２倍である（ｎ＝７）

（Ｇ）ＩｇＧまたはＩｇＭ抗体がない

【００３１】

表１

Ａ．　高レベルＩｇＧ，ＭＤＡ－差

Ｐ　１１．　ＦＬＤＴＶＹＧＮＣＳＴＨＦＴＶＫＴＲＫＧ

Ｐ　２５．　ＰＱＣＳＴＨＩＬＱＷＬＫＲＶＨＡＮＰＬＬ
Ｐ　７４．　ＶＩＳＩＰＲＬＱＡＥＡＲＳＥＩＬＡＨＷＳ
Ｂ．　高レベルＩｇＭ，　ＭＤＡ－差なし
Ｐ　４０．　ＫＬＶＫＥＡＬＫＥＳＱＬＰＴＶＭＤＦＲＫ
Ｐ　６８．　ＬＫＦＶＴＱＡＥＧＡＫＱＴＥＡＴＭＴＦＫ
Ｐ　９４．　ＤＧＳＬＲＨＫＦＬＤＳＮＩＫＦＳＨＶＥＫ
Ｐ　９９．　ＫＧＴＹＧＬＳＣＱＲＤＰＮＴＧＲＬＮＧＥ
Ｐ　１００．ＲＬＮＧＥＳＮＬＲＦＮＳＳＹＬＱＧＴＮＱ
Ｐ　１０２．ＳＬＴＳＴＳＤＬＱＳＧＩＩＫＮＴＡＳＬＫ
Ｐ　１０３．ＴＡＳＬＫＹＥＮＹＥＬＴＬＫＳＤＴＮＧＫ
Ｐ　１０５．ＤＭＴＦＳＫＱＮＡＬＬＲＳＥＹＱＡＤＹＥ
Ｐ　１７７．ＭＫＶＫＩＩＲＴＩＤＱＭＱＮＳＥＬＱＷＰ
Ｃ．　高レベルＩｇＧ，　ＭＤＡ　差なし
Ｐ　１４３．　ＩＡＬＤＤＡＫＩＮＦＮＥＫＬＳＱＬＱＴＹ
Ｐ　２１０．　ＫＴＴＫＱＳＦＤＬＳＶＫＡＱＹＫＫＮＫＨ
Ｄ．　ＮＨＳ／ＡＨＰ，　ＩｇＧ－ａｋ　＞　２，　ＭＤＡ－差
Ｐ　１．　ＥＥＥＭＬＥＮＶＳＬＶＣＰＫＤＡＴＲＦＫ
Ｐ　１２９．　ＧＳＴＳＨＨＬＶＳＲＫＳＩＳＡＡＬＥＨＫ
Ｐ　１４８．　ＩＥＮＩＤＦＮＫＳＧＳＳＴＡＳＷＩＱＮＶ
Ｐ　１６２．ＩＲＥＶＴＱＲＬＮＧＥＩＱＡＬＥＬＰＱＫ
Ｐ　２５２．　ＥＶＤＶＬＴＫＹＳＱＰＥＤＳＬＩＰＦＦＥ
Ｅ．　ＮＨＳ／ＡＨＰ，　ＩｇＭ－ａｋ　＞　２，　ＭＤＡ－差
Ｐ　３０１．　ＨＴＦＬＩＹＩＴＥＬＬＫＫＬＱＳＴＴＶＭ
Ｐ　３０．　ＬＬＤＩＡＮＹＬＭＥＱＩＱＤＤＣＴＧＤＥ
Ｐ　３１．　ＣＴＧＤＥＤＹＴＲＫＩＫＲＶＩＧＮＭＧＱ
Ｐ　３２．　ＧＮＭＧＱＴＭＥＱＬＴＰＥＬＫＳＳＩＬＫ
Ｐ　３３．　ＳＳＩＬＫＣＶＱＳＴＫＰＳＬＭＩＱＫＡＡ
Ｐ　３４．　ＩＱＫＡＡＩＱＡＬＲＫＭＥＰＫＤＫＤＱＥ
Ｐ　１００．ＲＬＮＧＥＳＮＬＲＦＮＳＳＹＬＱＧＴＮＱ
Ｐ　１０７．ＳＬＮＳＨＧＬＥＬＮＡＤＩＬＧＴＤＫｌＮ
Ｐ　１４９．　ＷＩＱＮＶＤＴＫＹＱＩＲＩＱＩＱＥＫＬＱ
Ｐ　１６９．ＴＹＩＳＤＷＷＴＬＡＡＫＮＬＴＤＦＡＥＱ
Ｐ　２３６．　ＥＡＴＬＱＲＩＹＳＬＷＥＨＳＴＫＮＨＬＱ
Ｆ．　ＮＨＳ／ＡＨＰ，　ＩｇＧ－ａｋ　＜　０．５，　ＭＤＡ－差なし
Ｐ　１０．　ＡＬＬＶＰＰＥＴＥＥＡＫＱＶＬＦＬＤＴＶ
Ｐ　４５．　ＩＥＩＧＬＥＧＫＧＦＥＰＴＬＥＡＬＦＧＫ
Ｐ　１１１．　ＳＧＡＳＭＫＬＴＴＮＧＲＦＲＥＨＮＡＫ
Ｐ　１５４．　ＮＬＩＧＤＦＥＶＡＥＫＩＮＡＦＲＡＫＶＨ
Ｐ　１９９．　ＧＨＳＶＬＴＡＫＧＭＡＬＦＧＥＧＫＡＥＦ
Ｐ　２２２．　ＦＫＳＳＶＩＴＬＮＴＮＡＥＬＦＮＱＳＤＩ
Ｐ　２４０．　ＦＰＤＬＧＱＥＶＡＬＮＡＮＴＫＮＱＫＩＲ
Ｇ．
Ｐ　２．　ＡＴＲＦＫＨＬＲＫＹＴＹＮＹＱＡＱＳＳＳ

【００３２】

これらの３８のペプチド配列の全ては、アテローム動脈硬化症及び虚血性心疾患の進展に重要な役割を果たす免疫応答の標的を表す。従って、これらのペプチドは、アポリポプロテインＢにおけるＭＤＡ変性アミノ酸の定められた配列に対する抗体レベルと心疾患の進展のリスクとの関連を決定するＥＬＩＳＡの開発に使用され得る。

【００３３】

これらのペプチドは、酸化ＬＤＬで免疫した実験動物に見られる保護免疫の可能なメディ

エータをも表し、アテローム動脈硬化症に対する免疫療法またはワクチンのさらなる開発における試験のために使用され得る。

【００３４】

このように、ヒトアポリポプロテインＢにおける３８の異なる配列が、ヒトにおいて免疫応答を著しく上昇させることが確認された。これらのエピトープは、酸化ＬＤＬに対する抗体としてあらかじめ記載されたものを表すと考えられる。殆どの免疫応答は、ペプチド配列を指向し、アポリポプロテインＢはＬＤＬにおける唯一のタンパク質であるので、このプロジェクトで用いられる試みは、酸化ＬＤＬ粒に対する本質的に全ての抗体についての特異的なエピトープを同定することができるであろう。カルジオリピンに対する抗体を含むリン脂質特異的抗体ファミリーが酸化ＬＤＬと反応するが、これらの抗体の特異性及び役割は完全に特徴的であり続けることが記載されている。

【００３５】

多くの場合、ＭＤＡ変性ペプチドに対する抗体力価は、対応する天然型ペプチドのものより高い。ＭＤＡ変性ペプチドに対する抗体が検出された場合、それはほぼ常に天然型配列に対する抗体の存在と関連する。これに対する説明としては、アポリポプロテインＢにおいてＭＤＡ変性アミノ酸（ＬＤＬ酸化の結果生じるＭＤＡ変性）に対する免疫応答が天然型の配列に対する許容性の破壊を導くことが考えられる。他の配列については、ＭＤＡ変性と天然型配列に対する抗体力価に差はない。これは、免疫応答が天然型配列に対するものを指向していることを提案する。免疫系に通常さらされているタンパク質のアミノ酸配列に対する免疫応答はない。天然型ＬＤＬ粒において、アポリポプロテインＢの大部分はＬＤＬのリン脂質層に隠れているので、免疫系にアクセスできない。ＬＤＬの酸化の間に、アポリポプロテインＢのアミノ酸鎖は断片化され、三次元構造に変化が生じる。これにより、通常は免疫応答にアクセス不可能なペプチド配列が露出し、これらの配列に対する抗体が生成すると考えられ、これが天然型のアポリポプロテインＢに対する抗体の存在が見られることを説明するであろう。さもなければ、真の免疫応答は、ＭＤＡ変性配列に対するものであるが、天然型の配列と交差反応性を有し、結合に差がないほど大きいことが示されるであろう。

【００３６】

表２

７８人の被験者（後天的に進展した心筋梗塞、２６の健常対照群（healthy controls）及び２６の疾病はないが高リスクの個体）における異なるペプチドと内膜／中膜の厚さとして評価した頸動脈におけるアテローム動脈硬化症との相関

ペプチド	ＩｇＧ		ＩｇＭ	
	天然型	ＭＤＡ－変性	天然型	ＭＤＡ－変性
３０１				＋
１０			＋	＋
１１			＋　＋	＋
２５	＋	＋	＋　＋	＋　＋　＋
３０				＋　＋
３１			＋　＋	＋　＋
３２				＋　＋
３３				＋
３４				＋
４５		＋　＋	＋　＋	＋　＋　＋
７４	＋　＋	＋	＋	＋　＋
９９				
１００			＋	＋　＋
１０２				＋　＋
１０３			＋	
１０５				
１２９			＋　＋	＋　＋　＋
１４３	＋	＋	＋　＋	＋
１４８				＋
１５４			＋　＋　＋	＋　＋
１６２			＋	＋　＋
１９９				
２１０			＋	
２４０			＋　＋	＋　＋

＋，ｒ＞０．２＜０．３，ｐ＝＜０．０５；＋＋，ｒ＞０．３＜０．４，ｐ＝０．０１；＋＋＋，ｒ＞０．４，ｐ＝＜０．００１，灰色，心筋梗塞に罹患した群で顕著に増加したペプチド抗体レベル

【００３７】

酸化ＬＤＬ中の特定のエピトープに対する免疫反応と心疾患の進展の存在及び／または危険性との関係を調べるために、これらのペプチド（天然型またはＭＤＡ変性型）に基づいたＥＬＩＳＡを使用し得る可能性を、予備的研究として調べた。この研究は、マルモ　ダイエット　キャンサー　スタディ（Malmo Diet Cancer study）（人口ベースの研究）に参加した被験者について行われ、１９８９年と１９９３年の間に３０，０００以上の個体を募集した。表１に列挙した３８のペプチドのうちの２４のペプチドに対する抗体レベルを、継続期間に急性心筋梗塞が進展した２６人の被験者、年齢、性及び喫煙の有無を合わせた２６の健常者対照群の基線の血漿サンプルについて調べた。年齢、性及び喫煙の有無を合わせた、ＬＤＬコレステロール値が５．０　ｍｍｏｌ／ｌ以上の群も、心疾患が進展していない高リスクグループ中の抗体レベルを研究するために含めた。

【００３８】

分析された２４のペプチドのうちの１９のペプチドについては、ＭＤＡ変性ペプチドに対するＩｇＭ抗体レベルと、総頚動脈の超音波調査によって評価されるような頚動脈（内膜／中膜厚さ）中のアテローム性動脈硬化症の程度の間に著しい相関性が確認された。即ち、より高い抗体レベルはより増大したアテローム性動脈硬化症となる（表２）。これらのペプチドの多くに、天然のペプチドに対する抗体のレベルと頚動脈の内膜／中膜厚さとの著しい相関性が存在した。４つのペプチドだけが、ＩｇＧ抗体と頚動脈の内膜／中膜厚さとの著しい相関性を示した。これらの観察は、アテローム性動脈硬化症が進展した患者の

確認に、ＭＤＡ変性ペプチド（単独で、あるいは組み合わせて）を使用するＥＬＩＳＡを使用し得ることを示唆する。

【００３９】

試験したペプチドのうちの４つは、アテローム性動脈硬化症が進展した存在に関連するだけでなく、その後心筋梗塞を罹患した患者群においても著しく上昇した（表２）。これらのペプチドのうちの１つ（ペプチド２４０）のデータを図７に示す。これらの観察は、さらに、ペプチドベースのＥＬＩＳＡが心筋梗塞が進展する危険が増加している患者を確認するのにも使用し得ることを示す。

【００４０】

また、後に心筋梗塞に罹患した群においても、天然型のペプチド１０３、１６２及び１９９、及びＭＤＡ変性ペプチド１０２に対するＩｇＧ抗体レベルの著しい増加があった。しかしながら、これらのペプチドに対するＩｇＧ抗体は、頚動脈中のアテローム性動脈硬化症の存在にはそれほど関係していなかった。

【００４１】

特に興味深い観察は、健常者対照群及び高リスクグループ（５．０　ｍｍｏｌ／ｌより高いＬＤＬコレステロール）において、心筋梗塞が進展したグループよりも著しく高いレベルのＩｇＭ抗体が存在したＭＤＡ変性ペプチド２１０に対する抗体に見られた。従って、ＭＤＡ変性ペプチド２１０に対する抗体は、心疾患が進展する危険性が減少した個体のためのマーカーを表わし得る。

【００４２】

天然型及びＭＤＡ変性アポＢ－１００ペプチド配列による免疫感作が実験動物にアテローム性動脈硬化症の抑制をもたらすことが示された（ノーディン　フレドリクソン（Nordin Fredrikson）、（ソダーバーグ他）（Soderberg et al）、シュー他（Chyu et al））。これらのアテロームの防御免疫応答が作動するメカニズムはまだ完全には解明されていない。しかしながら、考えられる可能性は、これらのペプチド配列に対して生成された抗体によってアテロームの保護効果が媒介されるということである。これらの抗体は、例えばマクロファージＦｃ受容体による酸化的に損傷したＬＤＬ粒子の除去を促進するであろう。

【００４３】

マクロファージスカベンジャー受容体は、広範囲の酸化的損傷を伴うＬＤＬのみを認識する。最近の研究により、循環する酸化ＬＤＬの存在が確認された（１０，１１）。これらの粒子は、最小の酸化的損傷のみを有しており、スカベンジャー受容体によって認識されない。循環する酸化ＬＤＬ粒子への抗体の結合は、それらが血管組織に蓄積する前に、循環からそれらを取り除かれるのを助ける（１２）。

【００４４】

いくつかの研究は、アテローム性動脈硬化症からの保護における抗体用の役割を支持した。Ｂ細胞の再構成は、脾臓が摘出されたアポ　Ｅ　ｎｕｌｌマウス（１３）におけるアテローム性動脈硬化症の進展及びＲＡＧ－１マウスにおける頚動脈の傷の後の新内膜形成を抑制した（我々の研究所からの出版されていない観察）。さらに、免疫グロブリンを繰り返し注射することによりアポ　Ｅ　ｎｕｌｌマウス中のアテローム性動脈硬化症が縮小されることが示された（６）。

【００４５】

上記で論じたように、アポＢ－１００の中のＭＤＡ変性ペプチド配列に対する抗体は、合成ペプチドを用いた能動免疫感作により生じ得る。この方法は、抗体産生の完全な効果が得られるまでに、２～３週間を要する。

【００４６】

いくつかの状況においては、より迅速な効果が必要であり得る。一例として、酸化ＬＤＬが炎症に寄与している不安定なアテローム性動脈硬化のプラークが挙げられる。これらの状況下では、天然型及びＭＤＡ変性配列に対する精製された、または遺伝子組み換えにより生産された抗体の注入による受動免疫法が、より速い効果を奏し得る。

【００４７】
精製された、または遺伝子組み換えにより生産された抗体の注入による受動免疫法が有効である別の状況として、高齢の個体における冠動脈疾患が挙げられる。我々の研究により、人が高齢となるに従ってアポ　Ｂペプチド配列に対する抗体の減少が生じ、これが酸化ＬＤＬの血漿レベルの増加に関係していることが示された（ノーディン　フレドリクソン、ヘドラブ他（Hedblad et al））。このことは、酸化ＬＤＬにおいて、抗原に対する抗体産生を担う免疫細胞の老化を示唆し得る。また、循環からの酸化的に損傷したＬＤＬ粒子の不完全なクリアランスに帰するかもしれない。従って、これらの患者は、アポ　Ｂ－１００ペプチド配列による能動免疫法からよりも、精製された、または遺伝子組み換えにより生産された抗体の注入による受動免疫法により、さらに利益を受け得る。

【００４８】
下記で使用される合成の天然型ペプチド（ユーロ－ダイアグノスティカ　アクチボラゲット（Euro-Diagnostica AB）、マルモ（Malmo）、スウェーデン）は、最初にスクリーニングされたポリペプチドライブラリーからのペプチド１、２及び３０１であった。ペプチド１（アミノ酸配列：　ＥＥＥＭＬＥＮＶＳＬＶＣＰＫＤＡＴＲＦＫ、ｎ＝１０）及びペプチド３０１（アミノ酸配列：　ＨＴＦＬＩＹＩＴＥＬＬＫＫＬＱＳＴＴＶＭ、ｎ＝１０）は、各々天然型ペプチドよりも、ＭＤＡ変性ペプチドに対する高いＩｇＧまたはＩｇＭ抗体応答を有することが見出された。また、両方の力価は健常者において、より高い値であった。これらのペプチドは、これらのペプチドに対する抗体反応がアテローム性動脈硬化症に対して保護するかもしれないという仮定に基づいて選択された。

【００４９】
ペプチド２（アミノ酸配列：　ＡＴＲＦＫＨＬＲＫＹＴＹＮＹＱＡＱＳＳＳ、ｎ＝１０）は、初期の抗体スクリーニングにおいて抗体反応を誘起しなかったので、コントロールペプチドとして選択された。ミョウバンを投与したマウスをコントロール（ｎ＝９）に供した。

【００５０】
アポ　Ｅ（－／－）マウスに、６－７週齢で皮下に一次免疫を受けさせ、３週間後に腹腔内ブースターを行った。マウスに、免疫感作の開始からの高コレステロール食を与え、２５週齢で屠殺するまで継続した。屠殺時に、４グループのマウス中の体重に著しい違いはなかった。また、市販のキット（シグマ）を使用して測定された血清コレステロールに統計的な有意差はなかった。それらの平均血清コレステロール値はすべて７１５ｍｇ／ｄｌより高かった。

【００５１】
アテローム性動脈硬化のプラークによって覆われた下行大動脈の領域をオイルレッドＯ染色の後のｅｎ　ｆａｃｅ調製で測定した。コントロール群と比較すると、ペプチド番号２及び３０１で免疫したマウスにおいては、アテローム性動脈硬化の病巣が実質的に減少した（図２）。ペプチド番号１による免疫感作は、コントロール群と比較して、アテローム性動脈硬化症の顕著な減少を生じなかった。下行大動脈とは対照的に、大動脈根中のアテローム性動脈硬化症の病巣は４つの実験群で異なることはなかった（図３）。

【００５２】
大動脈洞プラークの大きさあるいはその脂質含量については、４つのグループで差はなかった（表Ａ）。４グループのマウスにおいて、大動脈弓中の平均プラークサイズに違いはなかった。しかしながら、オイルレッドＯ染色による胸部及び腹部の下行大動脈のプラークサイズのｅｎ　ｆａｃｅ評価は、コントロールグループとペプチド番号１のグループが大動脈に同様の量のアテローム性動脈硬化のプラークを有するのに対し、ペプチド番号２及び９のグループが大動脈に著しく縮小されたアテローム性動脈硬化の病巣を有していることを明らかにした（表Ａ）。ペプチド免疫感作は大動脈洞あるいは大動脈弓のプラークサイズに影響しなかったが、下行大動脈のプラークを縮小したという観察は興味深く、ペプチド免疫感作が新しいプラーク形成を縮小するかもしれないがプラークの進行に影響しないことを示唆する。

【００５３】
さらに、ペプチド免疫がアテローム性動脈硬化のプラークの表現型を調整するかどうか試験した。凍結切片の形態の大動脈洞プラークを単球／マクロファージ抗体（ＭＯＭＡ－２、セロテック（Serotec））で免疫組織化学的に染色した。
【００５４】
ｅｎ　ｆａｃｅ観察による発見と一致して、ペプチド番号２は、マクロファージの浸潤を実質的に減少させた（図１）。三色染色により、ペプチド番号２のグループからの大動脈洞プラークにおいて、平均４０．０±７．７％のコラーゲン含量が明らかになった；ミョウバンコントロールグループ、ペプチド番号１番のグループ、ペプチド番号９のグループの平均コラーゲン含量は、それぞれ３２．３±５．３％、３５．６±８．５％及び２９．４±９．６％であった。
【００５５】
各グループにおいて免疫感作したペプチドに対する抗体反応が測定された。免疫感作後の抗体価はペプチド番号１の群で６．１±３．１倍、ペプチド番号２のグループで２．４±１．０倍、ペプチド番号９のグループで１．８±０．６倍であったのに対し、ミョウバングループはペプチド番号１に対して３．９±２．７倍の増加、ペプチド番号２に対し２．０±０．５倍の増加、ペプチド番号９に対して２．０±０．９倍の増加であった。免疫グループとミョウバン処理グループの両方で免疫ペプチドに対する抗体価が並列的に増加したことは驚くべきことである。このことは、下記の可能性を意味するであろう：
（１）体液の免疫応答（細胞の免疫応答のような）以外のメカニズムは、アテローム性動脈硬化症を調整することに関与し得る；あるいは、（２）この抗体の増加は経時的コレステロール過剰血症に対するバイ－ストランダー（by-stander）反応であった。
【００５６】
なぜペプチド免疫感作がアテローム性動脈硬化症を縮小したかを説明し、及び／またはプラーク表現型を調整する明瞭な推定メカニズムはないが、この発明の新規性は免疫原としてＬＤＬのペプチドを使用すること及び免疫修飾手段としてのその実現可能性の点にある。このペプチドベースの免疫手段はアテローム性動脈硬化のプラークを調節する。抗原として同族のｏｘＬＤＬあるいは天然型のＬＤＬを使用した免疫感作により、プラークサイズが縮小されることが示されたが[1－3]、同族のヒトＬＤＬの有用性、生産、感染及び安全性の点から、このアプローチを臨床に適用するのは魅力に欠ける。我々の最終結果は、健常者におけるより高いＩｇＭまたはＩｇＧ抗体反応を有するペプチドを使用する免疫感作が、進行したアテローム性動脈硬化のプラークの進展から、実験動物を保護するかもしれないという我々の初期の仮説と異なるが、ペプチドベースの免疫療法が実現可能であることはここで実証される。
【００５７】
免疫ペプチド番号２を使用する免疫感作が下行大動脈における新しいアテローム性動脈硬化症の進展及びマクロファージ潜入の減少及びプラーク中のより高いコラーゲン含有量から動物を保護したことを見いだしたのは、そのペプチドが初期のヒトスクリーニングではなんの抗体応答をも与えなかったので、驚くべきことである。これは、（ａ）ペプチド番号２がヒトの免疫系に露出されていないアポ－Ｂ－１００蛋白質構造の一部であるからかもしれない。従って、抗体は健康なヒトの血清プールから生成されず検知されなかった；（ｂ）また、それはペプチド番号２のアミノ酸配列が、マウスにとっては外来であり、マウスは、新しいアテローム性動脈硬化症の形成を調整するこのペプチド及びその表現形に対する免疫応答を進展させないためであるとも考えられる。
【００５８】
プラークサイズが大動脈枝の異なる部分で評価される場合、プラークサイズに対する同族のＬＤＬ免疫の効果が変動した。例えば、アメリ他（Ameli et al）は、高コレステロール血症のウサギにおいて、天然型のＬＤＬによる免疫感作により大動脈のプラーク形成が縮小されることを示し[1]、フレイギャング（Freigang et al）は、プラークサイズの縮小を大動脈ではなく大動脈洞で示した。彼らの発見と本発明の発見を合わせると、ペプチド

免疫がプラークサイズだけでなくプラークの組成をも調整することが推測された。プラークを縮小する効果は、下行大動脈でのみ観察された。アポ　Ｅ（－／－）マウスは単一の動物の中の発展の様々な段階で、特に高コレステロール食を供給された時、アテローム性動脈硬化症を進展させることが知られている。若い動物におけるアテローム性動脈硬化症の初期の外観は大動脈洞にあり[6,7]、また１５週後の高脂、高コレステロール食による大動脈洞の疾病は進行したプラークであった。これに対し、アテローム性動脈硬化症の初期段階は下行大動脈にあった[6]。下行大動脈中のプラーク成熟及び進展の一時的な進行が、大動脈洞のそれと比べて遅いので、免疫感作が下行大動脈中の疾病の大きさを縮小したが、大動脈洞中の疾病はしないという発見は、免疫感作がアテローム性動脈硬化症組成の初期の段階に影響することを示唆する。高齢の、そして血清コレステロールの値が超生理学的である動物は、コレステロール過剰血の悪影響によって免疫感作のプラーク縮小効果が打ち消される可能性がある。さらに、大動脈洞プラークが早く成熟し、２５週齢で屠殺された場合、プラークサイズになんらかの差異を検出するには遅すぎる。病巣の大きさは大動脈洞プラーク中では調整されないが、ペプチド免疫感作によりプラークの組成は調整された。本発明の実験計画は、下行大動脈の進展の初期の段階のプラークの組成を検討することを妨げた。

【００５９】

実験結果は、アテローム性動脈硬化症を防ぐ新規なアプローチのための、あるいは重篤な高脂血症の場合でも順調にプラーク表現型を調整するための免疫源として、ＬＤＬ関連アポ　Ｂ－１００のペプチド配列を使用する実現可能性を強調する。このペプチドベースの免疫感作の手法は、同族のＬＤＬの絶縁及び単離及び調製の必要性及びそれに付随する汚染の危険性を排除できるので、抗原として同族のｏｘＬＤＬまたは天然型ＬＤＬを使用するよりも有利である。ペプチド番号２及び３０１による免疫感作のプラーク縮小効果は、下行大動脈でのみ見られた。これらの発見は、他の治療の介在も大動脈弓よりも下行大動脈で高い効果を示すという過去の報告とも矛盾せず、おそらく疾病が下行大動脈より大動脈の根及び大動脈弓でより急速に進展するので[14～17]、介在[14、15、16、18、19]のためのより小さな機会を作り出すと考えられる。下行大動脈中のプラーク成熟及び進展の一時的な進行が、大動脈洞及び大動脈弓でのそれと比べて遅いので、免疫感作が下行大動脈中で病巣サイズを縮小するが、大動脈洞中及び大動脈弓ではしないという発見は、免疫感作がアテローム性動脈硬化症組成の初期の段階を優先的に防ぐことを示唆する。高齢の、そして血清コレステロールの値が超生理学的である動物は、コレステロール過剰血の悪影響によって免疫感作のプラーク縮小効果が打ち消される可能性がある。病巣サイズは大動脈洞か大動脈弓で調整されなかったが、ペプチド番号２による免疫感作は、縮小されたマクロファージ浸潤及び増加したコラーゲン量の、より安定したプラーク表現型を生じさせる好ましい方向にプラークの組成を調整しなかった。要約すると、マウスモデル中のアテローム性動脈硬化症の抑制のための新規なペプチドベースの免疫調節アプローチが実証される。

【００６０】

要約すると、新規なペプチドベースの免疫調節アプローチが、アテローム性動脈硬化のプラークを調整することが実証される。我々のモデル中のアテローム性動脈硬化症組成の変化は中程度でしかなかったが、このペプチドベースの免疫感作はアテローム性動脈硬化症の研究、予防または治療において、代替ツールを提供し得る。

【００６１】

方法

ペプチドの調製

ペプチドは、イムジェクト（Imject）（登録商標）スーパーキャリヤ（SuperCarrier）（登録商標）ＥＤＣキット（ピアース、ロックフォード、イリノイ）を用い、製造者の指示に従い、小さな変更を加えて製造した。結合バッファー５００μｌ中のペプチド１ｇを２００μｌの脱イオン水中の２ｍｇの担体と混合した。その後、この混合物を１ｍｇの結合試薬（ＥＤＣ，１－エチル－３－［３－ジメチルアミノプロピル］カルボジイミドＨＣｌ

）と共に室温で２時間インキュベートした。その後、０．０８３Ｍリン酸ナトリウム、０．９Ｍの塩化ナトリウムｐＨ７．２溶液で４℃で一晩透析した。この透析結合物を、Ｉｍｊｅｃｔ乾燥配合生成バッファーで希釈し、最終容量を１．５ｍｌとした。免疫アジュバントとしてミョウバンを用い、容量比１：１でペプチド結合物と混合した。各免疫感作におけるペプチドの量は、注射一回あたり３３μｇ／１００μｌであった。

【００６２】

動物プロトコル

ジャクソン　ラボラトリーズ（Jackson Laboratories）（バー　ハーバー（Bar Habor）、メイン(Me)）からのアポＥ（－／－）マウスに、６～７週齢で皮下投与による第一回の免疫感作を行い、続いて３週後に腹腔内ブースターを行った。免疫感作開始時からマウスに高コレステロール食を与え、２５週齢で屠殺するまで続けた。２週間後、屠殺時に血液サンプルを集めた。ミョウバンを投与したマウスをコントロールとした。実験プロトコルは、セダーズ－シナイ（Cedars-Sinai）医療センターの動物管理使用委員会（Institutional Animal Care and Use Committee）に認可された。全てのマウスを米国認定動物管理研究所（American Association of Accreditation of Laboratories Animal Care）に委託した動物施設内に入れ、１２時間の昼夜サイクルで飼育し、水及び餌を制限せずに与えた。屠殺時にマウスにエンフルレンの吸入による麻酔をかけた。屠殺前に血漿をレトロオービタルブリード（retro-orbital bleeding）により採取した。

【００６３】

組織採取及び分割

アテローム動脈硬化の形成に対するペプチド免疫感作の効果を評価するために、大動脈洞、大動脈弓及び下行胸部及び腹部大動脈のプラークの大きさを評価した。心臓及び大動脈枝（tree）に生理学的な圧力で規定の食塩水をかけた後、心臓及び近位の大動脈を取り出し、ＯＣＴ化合物（ティシューテック（Tissue-Tek））に埋め込み、冷凍した。連続的な６μｍの厚切片を少なくとも２つの大動脈弁の外観から集め、大動脈洞プラーク評価用の大動脈弁の一片を消失させた。典型的には、連続する３つの切片が１枚のスライド上に置き、合計２５－３０枚のスライドを一匹のマウスから集めた。また、スライド五枚目毎に染色のためにグループ分けした。また、左鎖骨下動脈までの上行大動脈及び大動脈弓も同様に切片にし、処理した。胸部及び腹部の下行大動脈を、オイルレッドＯ染色の後にプラークの組成のｅｎ　ｆａｃｅ評価のために別々に処理した。

【００６４】

胸部及び腹部下行大動脈のｅｎ　ｆａｃｅ調製物

８ｇ／ｍｌの水中濃度の鶏卵アルブミン（シグマ）を、グリセリンと１：１で混合した。アジ化ナトリウムを添加し、アジ化ナトリウムの最終濃度を０．２％とした。胸部及び腹部の大動脈から周辺の組織及び脂肪を除去して清浄にした後、左側の腎臓部の動脈から鎖骨下動脈までの大動脈切片を、ヒストチョイス（Histochoice）（アムレスコ（Amresco））内で一晩定着させるために注意深く除去した。その後、大動脈は注意深く縦に開き、卵アルブミン溶液新たに被覆されたスライド上にルミナールと共にサイドアップで置いた。アルブミン溶液が乾燥したら、大動脈をオイルレッドＯで染色し、コンピューター補助組織学でアテローム性動脈硬化症の範囲を評価した。

【００６５】

免疫組織化学と組織学

大動脈洞からの切片を、標準のプロトコルを使用して、ＭＯＭＡ－２抗体（セロテック）で免疫組織化学的に染色した。コラーゲンの量及びプラークの大きさ及び脂質含有量についてのオイルレッドＯ染色を評価するためのトリクロム染色を、標準の染色プロトコルを用いて行った。コンピューター補助形態分析を、前記のように組織構造を評価するために行った[8]。

【００６６】

抗体力価測定

ペプチド免疫感作の後の抗体応答を測定するために、ＥＬＩＳＡを開発した。免疫化した

ペプチドに対する抗体力価を、ブースターの２週間後、屠殺時に集めた血液を使用して測定した。３つのペプチドに対する抗体応答を、同じタイミングのミョウバングループにおいて測定した。ＰＢＳ　ｐＨ　７．４（２０μｇ／ｍｌ）で希釈した天然型の合成ペプチドを、マイクロタイタープレートウェル（ヌンク　マキシソープ、ヌンク、ロスキルド、デンマーク）に吸着させ、４℃で一晩インキュベートした。０．０５０％のＴｗｅｅｎ－２０を含有するＰＢＳで洗浄した後、コーティングしたプレートを、ＴＢＳ中のスーパーブロック（ピアース）で室温で５分間ブロックし、その後、室温で２時間、ＴＢＳ－０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０（ＴＢＳ－Ｔ）中、１／５０に希釈したマウス血清を室温で２時間、その後４℃で一晩インキュベートした。すすいだ後、ペプチドを指向する抗体の付着物を、ＴＢＳ－Ｔの中で適切に薄められた、該ペプチドを指向する抗体の付着物を、ＴＢＳ－Ｔで適切に希釈したビオチニル化ウサギ抗マウスＩｇ抗体（ダコ　エイ／エス（Dako A/S），グロストラップ（Glostrup）、デンマーク）を使用して検出した。さらに２時間インキュベートした後、該プレートを洗浄し、結合したビオチニル化抗体をアルカリフォスファターゼ結合ストレプトアビジン（シグマ）によって検出し、室温で２時間でインキュベートした。ホスファターゼ基質キット（ピアース）を用いて着色反応を展開した。４０５ｎｍにおける吸光度を、室温で１時間のインキュベートの後に測定した。バックグランドを差し引いた後、平均値を計算した。

【００６７】

当然ながら、他のアッセーモデル、例えば、放射性免疫測定のような抗体を検出するイムノアッセー、ウェスタンブロッティング及びサザンブロッティング、並びにペプチドに結合した抗体の検出、酵素電極、及び他の分析方法も同様に利用できる。

【００６８】

統計

データは平均値±Ｓｔｄ．として示される。使用される統計方法は、本文、表または図に挙げた。Ｐ＜０．０５の時、統計的に有意であるとした。

【００６９】

表Ａ　大動脈洞のプラークサイズ及びその脂質含有量、大動脈弓プラークサイズ及び下行大動脈中のプラークの比率

	大動脈洞の総プラークサイズ　(mm²)	オイルレッドＯ（+）領域（大動脈洞プラーク%)	大動脈弓プラークサイズ (mm²)	大動脈プラーク% (flat pre)
ミョウバン	０．４９±０．１３	２１．７±４．４	０．０５７±０．０４０	２０±４．７
ペプチド1	０．４８±０．１４	３２．０±８．１	０．０５４±０．０２７	１７±４．３
ペプチド2	０．５２±０．１２	２３．９±３．５	０．０７８±０．０２２	６．３±１．９＊
ペプチド３０１	０．４６±０．１６	２３．８±４．１	０．０５０±０．０２４	８．９±２．２＊

＊ミョウバングループとの有意差。統計分析にはＡＮＯＶＡ、続いてターキー－クラマー（Tukey-Kramer）試験を使用した。

【００７０】

アポＥノックアウトマウスのアテローム性動脈硬化症におけるアポリポプロテインＢ－１００ペプチド配列の免疫感作の効果のデータを表Ｂに示す。

【００７１】

表Ｂ

アポＥノックアウトマウスにおけるアテローム性動脈硬化症のアポリポプロテインＢ－１００ペプチド配列による免疫感作の効果

【００７２】

複数のペプチド配列の混合物を用いた免疫感作

大動脈におけるアテローム性動脈硬化症に対する効果

1. ペプチド配列 143 及び 210	－６４．６％
2. ペプチド配列 11, 25 及び 74	－５９．６％
3. ペプチド配列 129, 148 及び 167	－５６．８％
4. ペプチド配列 99, 100, 102, 103 及び 105	－４０．１％
5. ペプチド配列 30, 31, 32, 33 及び 34	＋６．６％
6. ペプチド配列 10, 45, 154, 199 及び 240	＋１７．８％

【００７３】

単一ペプチド配列を用いた免疫感作

1. ペプチド配列　２	－６７．７％
2. ペプチド配列　２１０	－５７．９％
3. ペプチド配列　３０１	－５５．２％
4. ペプチド配列　４５	－４７．４％
5. ペプチド配列　７４	－３１．０％
6. ペプチド配列　１	－１５．４％
7. ペプチド配列　２４０	０％

【００７４】

ペプチドの投与は、通常、皮下注射、静脈注射、筋肉注射あるいは腹腔内注射のような注射によって行われる。第一の免疫の投与量は、体重、年齢及び他の身体的医学的条件に依存して、患者一人当たり１～１００ｍｇであり得る。特別な状況下では、１種類またはそれ以上のペプチドを含有する溶液をカテーテルによって冠状動脈の血管に局所投与することも可能である。血流への吸収を可能にするには認めるために特別の注意を払わなければならないが、経口投与も同様に考慮され得る。注射剤は、本発明の断片またはペプチドの一種類またはそれ以上を０．５～９９．５重量％を含有し得る。

【００７５】

ペプチドは通常、陽イオン化したウシ血清アルブミンに結合して、またアジュバントとして水酸化アルミニウムを使用して投与される。当該分野で知られている他のアジュバントも同様に使用することができる。

【００７６】

ペプチドの投与のための溶液はＥＤＴＡまたは酸化防止剤を含まない。

ペプチドは、アテローム性動脈硬化症に既に罹患している患者に治療剤として使用されてもよい。従って、本発明の断片またはペプチドの一種類またはそれ以上を加えるために、いかなる適切な投与経路を使用してもよい。

【００７７】

初期の研究は、ペプチドのどのタイプの酸化変性がヒトの血漿中で抗体によって認識されるに至るかを決定することに焦点を絞っていた。これらの研究は、ペプチド１－５及び２９７－３０２を使用して行われた。ＬＤＬの酸化中に、リン脂質及びコレステロールエステル中のポリ不飽和脂肪酸は、悪玉アルデヒド（ＭＤＡ）のような高度に反応性のブレークダウン生成物の生成にいたる過酸化を進行させる。その後、ＭＤＡは、それらを高度に免疫原性にするアポ　Ｂ－１００の中のリジン及びヒスチジン残基との共有結合付加物を

形成し得る。ＬＤＬの酸化は、さらに、免疫系には通常アクセス可能でないペプチド配列を露呈させるアポ　Ｂ－１００の分割に至る。天然型のペプチドが使用された実験において、ＭＤＡ変性の後、あるいはリン脂質リポソーム中への進入及びそれに続く銅の酸化またはＭＤＡ変性の後、ＩｇＭ抗体が、天然型のＭＤＡ及びリポソーム酸化ペプチドに対して同定され、抗体力価はＭＤＡ－ペプチド＞ＭＤＡ変性リポソームペプチド＞リポソーム酸化ペプチド＞天然型ペプチドであった。特異性試験は、ＭＤＡ変性ペプチドへの抗体の結合が、ＭＤＡ－ＬＤＬと銅酸化ＬＤＬの両方と競合することを示した。

【００７８】

その後、我々は、健常者対照群由来のプールされた血漿、及び抗原として、天然型及びＭＤＡ変性ペプチドを用いて、完全なペプチドライブラリーのスクリーニングを行った。アポ　Ｂ－１００中の多く部位に対する抗体が同定された。バックグラウンドコントロールの吸光度の２倍を陽性力価として切り落とし、完全なアポ　Ｂ－１００配列を構成する３０２個のペプチドのうちの１０２個に対する抗体を検出した。ＩｇＭ結合は、ＩｇＧ結合より本質的に豊富であった。一般に、結合はＭＤＡ変性ペプチド配列の方が対応する天然型ペプチド配列よりも高かったが、両者には著しい相関性があった。天然型及びＭＤＡ変性配列の両方への結合は、ＭＤＡ変性ＬＤＬ及び銅酸化ＬＤＬの添加により競合するが、天然型のＬＤＬによってはされない。これらの観察は、アポＢ－１００中のＭＤＡ変性ペプチド配列に対する免疫応答が、天然型の配列に対して交差反応性となることを示唆する。天然型のＬＤＬが天然型のアポ　Ｂ－１００ペプチド配列に結合する抗体に競合できないことは興味深いことであるが、これらの配列は単にＬＤＬ酸化の結果生じるアポ　Ｂ－１００の蛋白質分解の後に露出されるようになることを示し得る。分子の親水性と疎水性の部分のいずれも抗体により認識された。アポ　Ｂ－１００ペプチドライブラリーの第二のスクリーニングは、冠動脈疾患（ＣＨＤ、急性心筋梗塞（ＡＭＩ）及び不安定狭心症；ｎ＝１０）の臨床上の兆候のある患者からのプールされた血漿を使用して行われた。プールされたＣＨＤ血漿中の抗体は同じ配列に結合し、健常者対照群血漿中の抗体と全く同じ分布であった。しかしながら、ＣＨＤの患者からの血漿と比較し、コントロールの血漿ではいくつかのペプチド（＃１、３０～３４、１００、１０７、１４８、１４９、１６２、１６９、２３６、２５２及び３０１）の抗体力価は少なくとも２倍高く、少数のペプチド（＃１０、４５、１１１、１５４、１９９、２２２及び２４０）に対する力価はコントロールと比較して、ＣＨＤ患者からの血漿において高かった。その後、我々は、アポＢ－１００中のＭＤＡ変性ペプチド配列に対する抗体レベルがＣＨＤの進展の危険性を予測するかどうか調査する予想臨床研究を実施した。我々は、枝分かれケースコントロールデザイン（nested case control design）を用いて、冠動脈疾患（ＣＨＤによる、ＡＭＩあるいは死）を有する７８人の患者及びマルモ　ダイエット　キャンサー　スタディからの１４９人のコントロールを選択した。症例にもコントロール個体にもＭＩまたは脳卒中の病歴はなかった。封入から急性冠動脈疾患の平均期間は２．８年（０．１～５．９年の範囲）であった。抗体レベルを酸化防止剤を補充した基線血漿サンプル中で測定した。基線における超音波検査法によって評価される頚動脈の内膜－中膜厚さ（ＩＭＴ）を用いて、我々はさらに抗体レベルと既存の血管疾病の程度の関連性を調べた。我々は、初期のスクリーニング研究で、８つのＭＤＡ変性ペプチド配列を研究し、高い血漿抗体レベル（７４、１０２及び２１０）及び／またはコントロールとＣＨＤの血漿プールの著しい差（３２、４５、１２９、１６２及び２４０）を関連づけた。コントロールは、ＭＤＡペプチド７４に対するより高いＩｇＭレベルを有することが見いだされ（０．２５８、範囲０～１．１２３の吸光度単位対０．１７８、範囲０～０．７３２の吸光度単位、ｐ＜０．０５）、さもなければ症例とコントロールの間の抗体レベルの差はなかった。ＭＤＡペプチド１０２、１２９及び１６２（それぞれｒ＝０．２３３、０．２３２及び０．２３４、ｐ＜０．０５）に対する、ＩＭＴとＩｇＭの間の関連が症例において見られ、ＩＭＴとＭＤＡペプチド４５（ｒ＝０．１８、ｐ＜０．０５）との関連がコントロールにおいて見られた。ＭＤＡペプチド１２９の抗体と総及びＬＤＬコレステロール（ｒ＝０．１９及びｒ＝０．１９、ｐ＜０．０１）　間で弱い相関性が見られた。さもなければ、ペプチド抗体レベルは、

総血漿コレステロール、ＬＤＬコレステロール、ＨＤＬコレステロールあるいは血漿トリグリセリドと何の関連も示さなかった。異なるペプチドに対する抗体のレベルに強い共変動（ｒ値の範囲０．６～０．９）があった。唯一の例外は、他のペプチドに対する抗体に関連して、弱いか全くなかったＭＤＡペプチド７４に対する抗体であった。

【００７９】

ＭＤＡペプチド７４以外のすべての配列に対する抗体は、症例において年齢と逆の相関を示したが（－０．３８～－０．５８の範囲のｒ値、ｐ＜０．０１０．００１）、コントロールではそうではなかった。酸化ＬＤＬの血漿レベルは対照的に、年齢につれて増加した。この関連もコントロールより症例においてより強かった。ＭＤＡ変性ペプチド配列に対する免疫応答と心疾患の間の関連が異なる年齢グループにおいて異なっていたかを調査するために、平均年齢（６１才）の上か下かで、症例及びコントロールについてサブグループ分析を実施した。より若い年齢群の症例については、コントロールと比較してペプチド３２及び４５に対する抗体レベルが上昇し、ペプチド７４に対する抗体レベルが減少した。しかし、より高齢の年齢グループでは差は見い出されなかった。ペプチド７４を除くすべてのＭＤＡペプチド配列に対する抗体は、より若い年齢グループの中ではＩＭＴに著しく関連していたが、より高齢のグループでは関連しなかった（表）。

【００８０】

これらの研究により、ヒトの抗体によって認識されるアポ　Ｂ－１００の中の多くのＭＤＡ変性配列が同定された。ＬＤＬ酸化の結果アポ　Ｂ－１００のＭＤＡ変性が生じることは、これらの抗体が前記の酸化ＬＤＬ自己抗体のファミリーに属することを示す。この概念は、ＭＤＡ変性アポ　Ｂ－１００ペプチドに結合する抗体が酸化ＬＤＬの添加により競合されるという観察によっても支持される。ホーッコ（Horkko）らによって識別された、酸化したリン脂質と共に、これらのＭＤＡ変性ペプチド配列は、酸化ＬＤＬの中の大多数の抗原構造を構成すると考えられる。酸化ＬＤＬ抗リン脂質抗体と同様に、ＭＤＡ変性アポ　Ｂ－１００配列に対する抗体はＩｇＭ型であった。これは、さらに、後者の抗体がＴ　１５天然型抗体のファミリーに属していることを提案し得る。Ｔ　１５抗体は、初期の細菌感染に対するＴ細胞非依存性防御において、またアポトーシス細胞の除去において重要な役割を果たす。ここに記載したＭＤＡペプチド抗体が同様の機能を有するか調べることが残されている。多くの天然型アポ　Ｂ－１００配列に対する抗体も同定されている。しかしながら、天然型及びＭＤＡ変性された配列の抗体間の共変は、これらの抗体がＬＤＬ酸化に応じて形成されることをも提案する。さらに、ＭＤＡ変性ペプチド配列が、対応する天然型の配列と交差反応することも可能である。天然型のアポ　Ｂ－１００配列に対する抗体がさらに天然型のＬＤＬ粒子に結合する場合、これはＬＤＬの代謝にも重要な影響があると考えられる。しかしながら、天然型のＬＤＬが、天然型のアポ　Ｂ－１００に結合する抗体と競合しないという発見、及び天然型アポＢ－１００の配列に対する抗体とＬＤＬコレステロール値に関連がないことは、そのような減少の存在に反する。

【００８１】

ＭＤＡ変性ペプチド配列に対する抗体は、症例においては年齢とともに次第に減少したが、コントロールにおいてはそうではなかった。ＭＤＡペプチド７４を除き、ＭＤＡペプチドに対するＩｇＭ抗体は、より若い年齢グループ（６２才未満）では頚動脈のＩＭＴに関係していたが、より高齢のグループの中ではしていなかった。これらの発見は、５０才と７０才の間に、免疫系とアテローム性動脈硬化の血管壁の相互作用の著しい変化がおきることを提案する。１つの可能性は、より若い個体では、アテローム性動脈硬化の疾病プロセスが、免疫細胞のより顕著な関与のある、より活発な段階にあるということである。別の可能性は、より高齢の患者におけるＭＤＡ変性ペプチド配列に対する抗体レベルの減少が、アテローム性動脈硬化症に関与する免疫細胞の老化を反映するということである。免疫老化（immunosenescence）により免疫細胞の機能が害されることが、高齢者における伝染及び癌への感受性の増加に寄与することが提案されている。興味深いことに、免疫老化は酸化のストレスへの関与を示す酸化防止剤によって抑制される。酸化ＬＤＬの中のエピトープに相互作用する免疫細胞は酸化ストレスに特に露出されるであろう。酸化ＬＤＬが

非常に若い年齢で動脈の中に既にあるので、これらの免疫応答は、数十年間の間連続的に挑戦されており、これが免疫老化の進展にさらに寄与しているのであろう。

【００８２】

アポ　Ｂ－１００内の２つの部位に対する増加した抗体は、６２歳より下の患者の心筋梗塞及び冠動脈の死のための危険を予言することが見いだされた。これらの部位に対する抗体は、同じ根本的な病態生理学のプロセスに応じてそれらが生産されたことを提案する高レベルの共同変化を示した。血液のサンプリングから冠動脈疾患までの平均期間わずか２．８年であったという事実により、これらの抗体が特に増加したＣＨＤの危険のためのマーカーとして興味深くなる。ＭＤＡ変性アポ　Ｂ－１００ペプチド配列に対する抗体レベルが高脂血症、高血圧症及び糖尿病のような他のＣＨＤ危険因子とは関連を示さなかったことは、これらの抗体がＣＨＤの危険性の独立したマーカーであると示唆する。本発明の研究におけるＣＨＤの症例はそれほどハイリスクの個体ではなく、この点で一般的なＣＨＤ患者の代表例であった。ＭＤＡ変性アポ　Ｂ－１００配列に対するＩｇＭにより、確立している危険因子のスクリーニングによっては高リスクであるとはされなかった個体において急性冠動脈疾患の進展の短期の危険を予測されるという発見は、それが積極的な予防治療を必要とする個体を識別する際の有用な器具となることを提案する。しかしながら、アポ　Ｂ－１００のＭＤＡ変性ペプチド配列に対する抗体を決定する臨床値を完全に確立するには、多変量解析によるかなり大規模の予測研究が必要である。本発明の臨床研究の別の制限は、我々がアポ　Ｂ－１００の中の少数の抗原部位に対する抗体を分析しただけであり、他の部位に対する抗体力価が心血管の危険のよりよいマーカーとなるかもしれないということである。

【００８３】

６０才未満の患者においては、アポ　Ｂ－１００中の多くのＭＤＡ変性部位が、頚動脈のＩＭＴによって評価されるような既存の血管疾病の範囲と関連付けられた。ＩｇＭ抗体はＩｇＧ抗体よりも密接に頚動脈のＩＭＴに関係していた。頚動脈のＩＭＴは一般的なアテローム性動脈硬化の程度の基準として明白な制限があるが、これらの観察は、アポ　Ｂ－１００の中のＭＤＡ変性配列に対するＩｇＭの測定が存在しているアテローム性動脈硬化症の程度を評価する方法の一つとなり得ることを提案する。これらの観察は、さらに冠動脈疾病及び頚動脈疾病と酸化ＬＤＬに対するＩｇＭ抗体との関連をを報告したいくつかの従来の研究に整合する。

【００８４】

ペプチド７４に対する抗体は多くの点において他のアポ　Ｂ－１００ペプチド抗体と異なっていた。それらは症例よりもコントロールにおいて高く、年齢とともに減少することがなく、頚動脈疾患の程度には関連していなかった。従って、このペプチド配列に対する抗体は、アテロームの保護免疫応答のための興味深い候補を表わす。

【００８５】

重要な疑問は、なぜこれらの関連が生じるかである。それらは、ＭＤＡ変性アポＢ－１００部位に対する免疫応答がいかにアテローム性動脈硬化の疾病プロセスに関係するかを明白に実証する。高い抗体レベルは、より重篤なアテローム性動脈硬化症及びより増加した急性冠状動脈疾患の進展の危険と関連するので、一つの明白な可能性は、これらの免疫応答がアテローム発生を促進するということである。ＨＳＰ　６５のような熱衝撃蛋白質に対する免疫応答がアテロームを発生することを実証する研究は、この概念をある程度支持する。しかしながら、動物実験研究は、酸化ＬＤＬ免疫のアテロームの保護効果を示した。脾臓摘出アポ　Ｅ　Ｎｕｌｌマウスの Ｂ細胞の再構築により、アテローム性動脈硬化症が減少した。アテローム性動脈硬化症の縮小は、免疫グロブリンを繰り返し注射したアポ　Ｅ　ｎｕｌｌマウスでも見られた。本発明の観察は、必ずしも、酸化ＬＤＬに対する免疫応答のアテロームの保護役割について論じているのではない。これらの免疫応答は、ＬＤＬ酸化のような前アテローム発生のプロセスによって活性化される。従って、それらは、さらに疾病プロセスの重篤さに比例すると考えられ、疾病進行に寄与することなく、疾病の重篤さ及びＣＨＤの危険のマーカーとして寄与することができた。二つの関連文献で

報告されたアポ　Ｂ－１００ペプチド配列によるアポ　Ｅ　ｎｕｌｌマウスの免疫が、アテローム性動脈硬化症の進展を抑制するという発見は、症例となると考えられる。確かに、本発明の研究の最も重要な結果は、アテローム性動脈硬化症に対するワクチンコンポーネントとして使用することができる構造の同定である。年齢により生じるアポ　Ｂ－１００の中のＭＤＡ変性ペプチド配列に対する抗体の減少には、酸化ＬＤＬの血漿レベルの増加が伴うという認識は、循環からの最小に酸化されたＬＤＬのクリアランスの増加が、これらの抗体がアテローム性動脈硬化症に対して保護することができるメカニズムの一つであることを提案する。

【００８６】

方法

研究人口

研究対象、１９２６－４５の間の、マルモ（Malmo）「ダイエット　アンド　キャンサー（Diet and Cancer）（ＭＤＣ）」研究集団に属するボー（borr）。１９９１年１１月と１９９４年２月の間のＭＤＣ研究に入った人間の任意の５０％に、頚動脈の疫学に関する研究に参加することを依頼した。健康診断に続いて、動脈疾病、罹患率及び致死率についての情報の確認用ルーチン、並びに伝統的な危険因子の定義が報告された。

【００８７】

急性冠動脈疾患の８５の症例、即ち、致命的または非致命的なＭＩまたは冠動脈疾患（ＣＨＤ）による死が確認された。心筋梗塞か脳卒中の病歴を有する参加者（ｎ＝６）は、本発明の研究に参加する資格がない。各症例について、心筋梗塞または脳卒中の病歴のないコントロール２名を、年齢、性別、喫煙習慣、高血圧症の存在、スクリーニング試験への参加月数及び継続期間を個々に合わせて用いた。ロジスティックの理由（血液サンプルはペプチドの評価に十分な量で利用することはできなかった）により、７つの症例については１名のコントロールのみが利用可能であり、１つの症例にはコントロールがなかった。この症例は分析から除外された。従って、研究人口は、２２７人の患者、７８の症例及び１４９のコントロールからなり、基線において年齢は４９－６７才（平均６１才）であった。

【００８８】

研究所分析

一晩絶食した血液サンプルを、総コレステロール、トリグリセリド、ＨＤＬコレステロール、ＬＤＬコレステロール及び全血グルコースの血清値の測定のために採取した。ＬＤＬコレステロールは、フライドウォルド（Friedewald）式によりｍｍｏｌ／Ｌに計算した。酸化ＬＤＬは、ＥＬＩＳＡ（マーコーディア（Mercordia））によって測定した。　Ｂモード超音波バスキュログラフィー（vasculography）ＭＨＺ変換器を備えたアキューソン１２８コンピュータ断層撮影法システム（アキューソン（Acuson）、マウンテンビュー（Mountain View）、カリフォルニア）を、前記のような右頚動脈の中で頚動脈プラークの評価に使用した。

【００８９】

アポＢ１００ペプチド配列に対するＥＬＩＳＡの開発

全ヒトアポリポプロテインＢアミノ酸配列に相当する３０２個のペプチドを合成し（ユーロ－ダイアグノスティカ　アクチボラゲット、マルモ、 スウェーデン及びケイアイ　ロス　ペターソン　エイエス、ホーホルム、デンマーク）、ＥＬＩＳＡで使用した。各合成ペプチドのフラクションを０．５ＭのＭＤＡ（シグマ－アルドリッチ　スウェーデン　アクチボラゲット、ストックホルム、スウェーデン）、０．５ＭのＭＤＡにより３７℃で３時間、及びリポソームの存在下で０．５ＭのＭＤＡにより３７℃で３時間または５ｍＭの$CuCl_2$（シグマ）により３７℃で１８時間変性した。ＭＤＡ変性ペプチドを、いくつかの変更をした１ｍＭのＥＤＴＡを含有するＰＢＳで４℃で１８時間透析した。該ペプチドの変性を、ペプチドの分離に適する変性ポリアクリルアミドゲル（バイオ－ラッド　ラボラトリーズ、ハーキュリーズ、カリフォルニア）で試験した。

【００９０】

クロロホルム溶液中、モル比９：１の卵ホスファチジルコリン（ＥＰＣ）（シグマ）とホスファチジルセリン（ＰＳ）（シグマ）の混合物及び３ｍＭのリン脂質（ＰＬ）を、ガラス血管中、穏やかなアルゴン流下で蒸発させた。その後、該溶液を真空下に３時間置いた。滅菌濾過１０ｍＭＨＥＰＥＳバッファー，ｐＨ７．４中の０．１０ｍＭペプチド（５ｍｌ）、１４５ｍＭのＮａＣｌ及び０．００３％のナトリウムアジドをＥＰＣ／ＰＳ乾燥フィルムに添加し、５０℃で１５分間インキュベートした。この混合物を室温で５分間おだやかにボルテックスミキサーで混合し、その後氷冷浴に入れ、７．４アンプリチュードミクロンで１分間の間隙を入れて３分間で３回、超音波処理した（ソニープレップ１５０ＭＳＥ　サンヨー、タムローメドラブ、スウェーデン）。このＰＬペプチド混合物（天然型または０．５ＭのＭＤＡにより３７℃で３１１変性または５ｍＭの$CuCl_2$により３７℃で１８時間変性したもの）をガラスバイアル中にアルゴン下、４℃で、アルミホイルで封をして貯蔵し、１週間以内に使用した。このＭＤＡ変性混合物を、貯蔵前に、いくつかの変更をした１ｍＭのＥＤＴＡを含有するＰＢＳで４℃で１８時間透析した。該混合物の変性を、ペプチドの分離に適する変性ポリアクリルアミドゲル（バイオ－ラッド　ラボラトリーズ　エイエス、サンドバイバーグ、スウェーデン）で試験した。

【００９１】

リポソームの存在下または不存在下でＰＢＳ，ｐＨ７．４（２０ｌｅｇ／ｍｌ）で希釈した天然のまたは変性した合成ペプチドを、マイクロタイタープレートウェル（ヌンク　マキシソープ、ヌンク、ロスキルド、デンマーク）に吸着させ、４℃で一晩インキュベートした。参照用として、ペプチドの一つ（Ｐ６）を、各プレートに流した。０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を含有するＰＢＳ（ＰＢＳ－Ｔ）で洗浄した後、コーティングされたプレートを、ＴＢＳ中のスーパーブロック（ピアース、ロックフォード、イリノイ）で室温で５分間ブロックし、続いて、ＴＢＳ－０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０（ＴＢＳ－Ｔ）で希釈されたプールされたヒト血漿を室温で２時間、その後４℃で一晩インキュベートした。すすいだ後、該ペプチドに対する自己抗体の付着を、ＴＢＳ－Ｔで適当に希釈したビオチニル化ウサギ抗ヒトＩｇＧまたはＩｇＭ抗体（ダコ　エイ／エス、グロストラップ、デンマーク）を用いることにより検出した。さらに室温で２時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、結合したビオチニル化抗体をアルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジン（シグマ）で検出し、室温で２時間インキュベートした。着色反応を、ホスファターゼ基質キット（ピアース）を用いて展開し、室温で１時間インキュベートした後、４０５ｎｍの吸収を測定した。異なるペプチドの吸収値をＰ６の吸収値で分け、比較した。

【００９２】

統計

ＳＰＳＳを統計分析のために使用した。適切な場合、結果は平均値と範囲として、および比率として示される。ボックスプロット（Boxplot）とスキャッタープロット（scatterplots）を、症例および対応するコントロール中の年齢と選択されたペプチドの関係を説明するために使用した。対応するグラフも、年齢と選択されたペプチドの関係を、症例およびコントロールについて、基線の平均年齢（６１才）未満または以上で、また別に平均年齢未満の症例及びコントロールについて例証するために使用した。症例とコントロールでは、別々に、年齢と性別のために調整された部分的な相関係数が、選択されたペプチドおよび血液脂質レベルと共通の頚動脈のＩＭＴの間で計算された。年齢及び性別で調節した部分的な相関係数は、平均年齢以下およびそれ以上で症例およびコントロールにおける共通の頚動脈のＩＭＴと選択されたペプチドの間で計算された。独立のサンプルｔ－検定は通常分配された連続変数を評価するために、カイ二乗検定は症例とコントロールの比率を評価するために使用された。非パラメーター検定（マン－ホイットニー）は症例とコントロールの間の非通常分配された連続変数を評価するために使用された。ｐ－値はすべて両側（two-tail）である。

【００９３】

表

心筋梗塞心筋梗塞のある若い患者（４９－６１才）および高齢の患者（６２－６７才）に

おける、及び年齢、性別、喫煙および高血圧症を一致させたそれらの対応するコントロールにおける、年齢及び性別で合わせた異なる基線ＭＤＡペプチドおよび共通の頚動脈内膜中膜厚さのための相関係数

ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ	49-61才の症例及びコントロール n=116	62-67才の症例及びコントロール n=111
IGM		
MDA32	0.235t	-0.101
MDA45	0.366$	-0.030
MDA74	0.178	0.063
MDA102	0.255$	-0.039
MDA129	0.330$	-0.009
MDA 162	0.2451	0.001
MDA 210	0.254	0.013
MDA、240		
IGG		
MDA215	0.119	-0.059

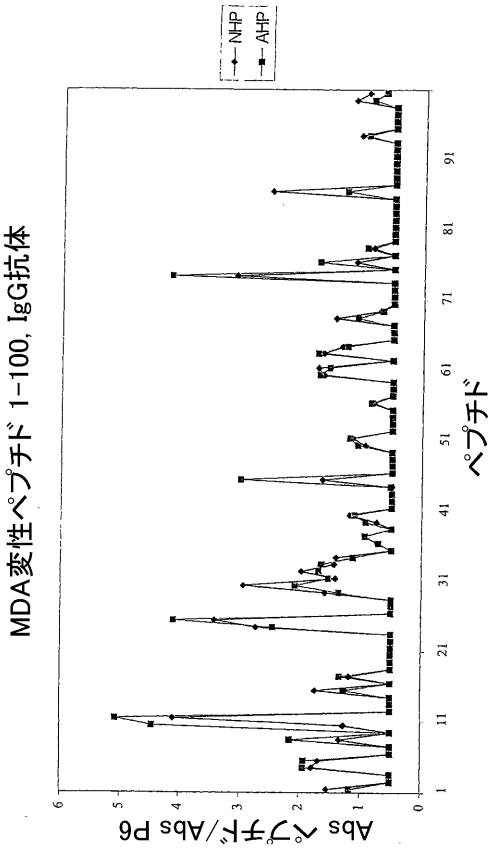
p〈0.05;$/x0.01

【図面の簡単な説明】

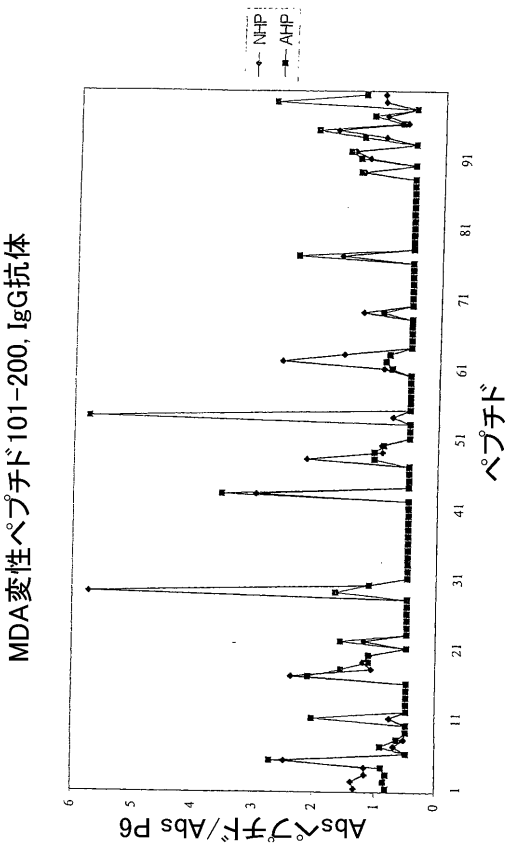
【００９４】

図１～６は本発明により調製された異なるペプチドの抗体反応を示す。

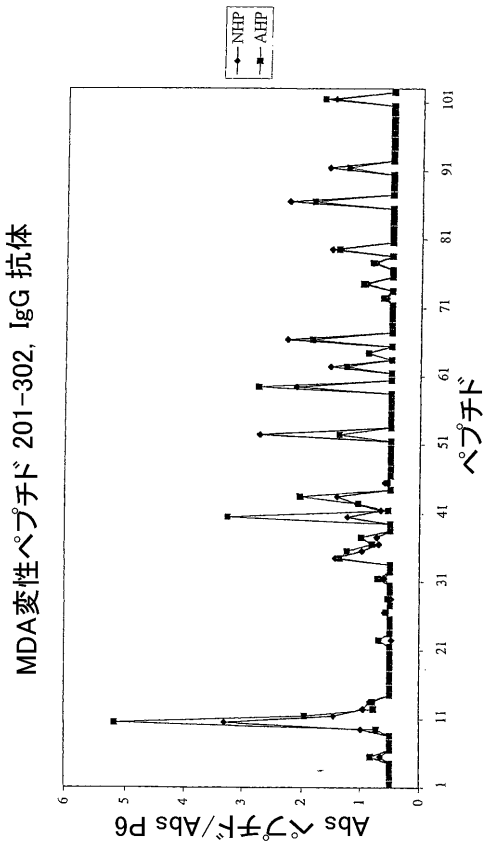
【図１】


MDA変性ペプチド 1-100, IgG抗体
NHP
AHP
Abs ペプチド/Abs P6
ペプチド

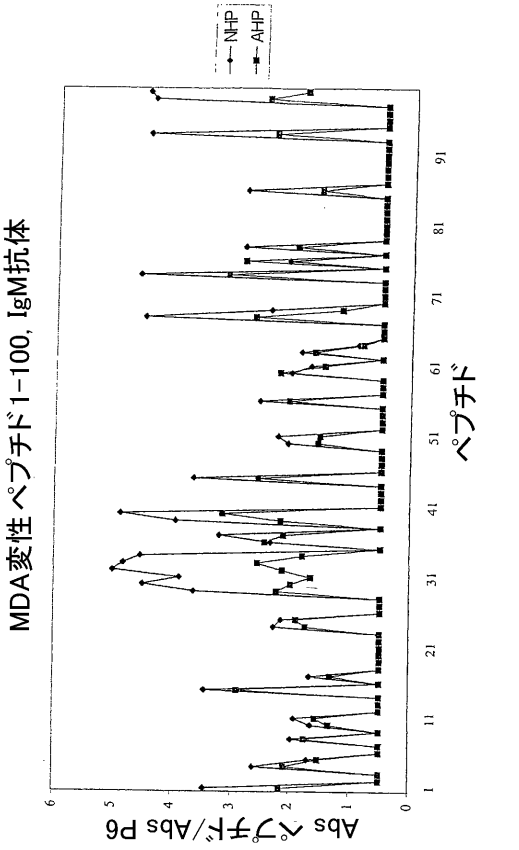
【図２】


MDA変性ペプチド101-200, IgG抗体
NHP
AHP
Abs ペプチド/Abs P6
ペプチド

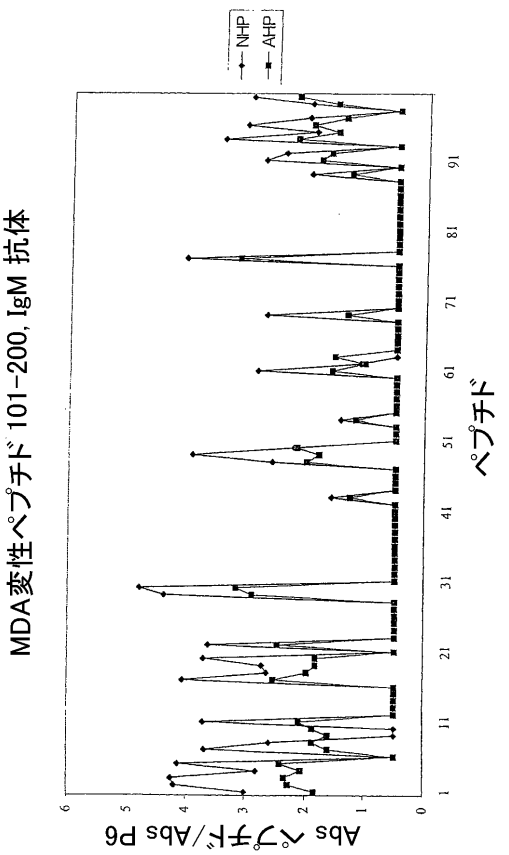
【図３】


MDA変性ペプチド 201-302, IgG 抗体
NHP
AHP
Abs ペプチド/Abs P6
ペプチド

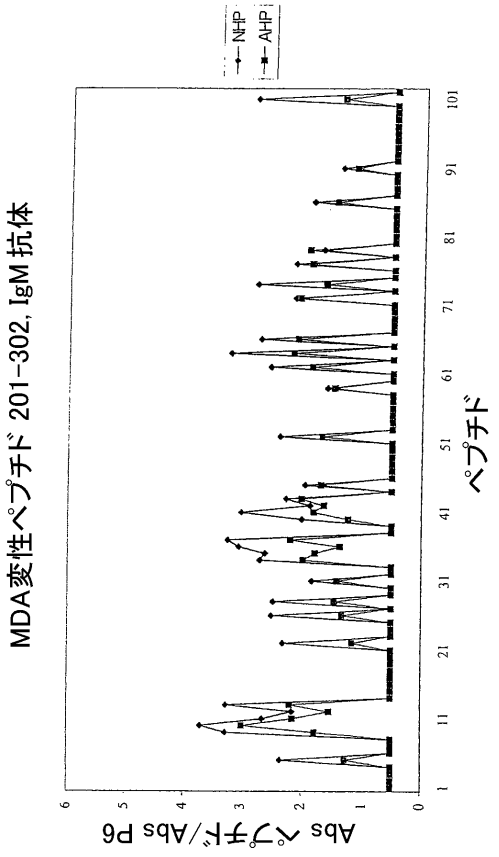
【図４】


MDA変性 ペプチド1-100, IgM抗体
NHP
AHP
Abs ペプチド/Abs P6
ペプチド

【図５】


MDA変性ペプチド 101-200, IgM 抗体
NHP
AHP
Abs ペプチド/Abs P6
ペプチド

【図６】


MDA変性ペプチド 201-302, IgM 抗体
NHP
AHP
Abs ペプチド/Abs P6
ペプチド

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/080954 A1

(51) International Patent Classification⁷: A61K 38/00

(21) International Application Number: PCT/SE02/00679

(22) International Filing Date: 5 April 2002 (05.04.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0101232-7 5 April 2001 (05.04.2001) SE
0103754-8 9 November 2001 (09.11.2001) SE

(71) Applicant: FORSKARPATENT I SYD [SE/SE]; Idéon, S-223 70 Lund (SE).

(72) Inventors: NILSSON, Jan; Toppeladugård 3, S-240 13 Genarp (SE). SHAH, Prediman, K.; 111 North Layton Drive, Los Angeles, CA 90049 (US).

(74) Agent: STRÖM & GULLIKSSON IP AB; Sjöporten 4, S-417 64 Göteborg (SE).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/080954 A1

(54) Title: PEPTIDE-BASED IMMUNIZATION THERAPY FOR TREATMENT OF ATHEROSCLEROSIS AND DEVELOPMENT OF PEPTIDE-BASED ASSAY FOR DETERMINATION OF IMMUNE RESPONSES AGAINST OXIDIZED LOW DENSITY LIPOPROTEIN

(57) Abstract: The present invention relates to fragments of apolipoprotein B, in particular defined peptides thereof, for immunization or therapeutic treatment of mammals, including humans, against ischemic cardiovascular diseases, as well as diagnosing the presence or absence of antibodies related to increased or decreased risk of developing ischemic cardiovascular diseases, using one or more of said peptides in an ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

PEPTIDE-BASED IMMUNIZATION THERAPY FOR TREATMENT OF ATHEROSCLEROSIS AND DEVELOPMENT OF PEPTIDE-BASED ASSAY FOR DETERMINATION OF IMMUNE RESPONSES AGAINST OXIDIZED LOW DENSITY LIPOPROTEIN

DESCRIPTION

Technical field

The present invention relates to new peptides, in particular peptides to be used for immunization therapy for treatment of atherosclerosis, and for development of peptide based ELISA for the determination of immune response against oxidized low density lipoprotein and the diagnosis of the presence or absence of atherosclerosis.

In particular the invention includes:

1) The use of any of the peptides listed in table 1, alone or in combination, native or MDA-modified, preferably together with a suitable carrier and adjuvant as an immunotherapy or "anti-atherosclerosis "vaccine" for prevention and treatment of ischemic
2) cardiovascular disease.
3) The use of the same peptides in ELISA for detection of antibodies related to increased or decreased risk of development of ischemic cardiovascular diseases.

Background

Atherosclerosis is a chronic disease that causes a thickening of the innermost layer (the intima) of large and medium-sized arteries. It decreases blood flow and may cause ischemia and tissue destruction in organs supplied by the affected vessel. Atherosclerosis is the major cause of cardiovascular disease including myocardial infarction, stroke and peripheral artery disease. It is the major cause of death in the western world and is predicted to become the leading cause of death in the entire world within two decades.

The disease is initiated by accumulation of lipoproteins, primarily low-density lipoprotein (LDL), in the extracellular matrix of the vessel. These LDL particles aggregate and undergo oxidative modification. Oxidized LDL is toxic and cause vascular injury. Atherosclerosis represents in many respects a response to this injury including inflammation and fibrosis.

In 1989 Palinski and coworkers identified circulating autoantibodies against oxidized LDL in humans. This observation suggested that atherosclerosis may be an autoimmune disease caused by immune reactions against oxidized lipoproteins. At this time several laboratories began searching for associations between antibody titers against oxidized LDL and

cardiovascular disease. However, the picture that emerged from these studies was far from clear. Antibodies existed against a large number of different epitopes in oxidized LDL, but the structure of these epitopes was unknown. The term "oxidized LDL antibodies" thus referred to an unknown mixture of different antibodies rather than to one specific antibody. T cell-independent IgM antibodies were more frequent than T-cell dependent IgG antibodies.

Antibodies against oxidized LDL were present in both patients with cardiovascular disease and in healthy controls. Although some early studies reported associations between oxidized LDL antibody titers and cardiovascular disease, others were unable to find such associations. A major weakness of these studies was that the ELISA tests used to determine antibody titers used oxidized LDL particles as ligand. LDL composition is different in different individuals, the degree of oxidative modification is difficult both to control and assess and levels of antibodies against the different epitopes in the oxidized LDL particles can not be determined. To some extent, due to the technical problems it has been difficult to evaluate the role of antibody responses against oxidized LDL using the techniques available so far, but, however, it is not possible to create well defined and reproducable components of a vaccine if one should use intact oxidized LDL particles.

Another way to investigate the possibility that autoimmune reactions against oxidized LDL in the vascular wall play a key role in the development of atherosclerosis is to immunize animals against its own oxidized LDL. The idea behind this approach is that if autoimmune reactions against oxidized LDL are reinforced using classical immunization techniques this would result in increased vascular inflammation and progressive of atherosclerosis. To test this hypothesis rabbits were immunized with homologous oxidized LDL and then induced atherosclerosis by feeding the animals a high-cholesterol diet for 3 months.

However, in contrast to the original hypothesis immunization with oxidized LDL had a protective effect reducing atherosclerosis with about 50%. Similar results were also obtained in a subsequent study in which the high-cholesterol diet was combined with vascular balloon-injury to produce a more aggressive plaque development. In parallel with our studies several other laboratories reported similar observations. Taken together the available data clearly demonstrates that there exist immune reactions that protect against the development of atherosclerosis and that these involves autoimmunity against oxidized LDL.

These observations also suggest the possibility of developing an immune therapy or "vaccine" for treatment of atherosclerosis-based cardiovascular disease in man. One approach to do this would be to immunize an individual with his own LDL after it has been oxidized by exposure to for example copper. However, this approach is complicated by the fact that it is not known which structure in oxidized LDL that is responsible for inducing the

protective immunity and if oxidized LDL also may contain epitopes that may give rise to adverse immune reactions.

The identification of epitopes in oxidized LDL is important for several aspects:

First, one or several of these epitopes are likely to be responsible for activating the anti-atherogenic immune response observed in animals immunized with oxidized LDL. Peptides containing these epitopes may therefore represent a possibility for development of an immune therapy or "atherosclerosis vaccine" in man. Further, they can be used for therapeutic treatment of atheroschlerosis developed in man.

Secondly, peptides containing the identified epitopes can be used to develop ELISAs able to detect antibodies against specific structure in oxidized LDL. Such ELISAs would be more precise and reliable than ones presently available using oxidized LDL particles as antigen. It would also allow the analyses of immune responses against different epitopes in oxidized LDL associated with cardiovascular disease.

US patent 5,972,890 relates to a use of peptides for diagnosing atherosclerosis. The technique presented in said US patent is as a principle a form of radiophysical diagnosis. A peptide sequence is radioactively labelled and is injected into the bloodstream. If this peptide sequence should be identical with sequences present in apolipoprotein B it will bind to the tissue where there are receptors present for apolipoprotein B. In vessels this is above all atherosclerotic plaque. The concentration of radioactivity in the wall of the vessel can then be determined e.g., by means of a gamma camera. The technique is thus a radiophysical diagnostic method based on that radioactively labelled peptide sequences will bound to their normal tissue receptors present in atherosclerotic plaque and are detected using an external radioactivity analysis. It is a direct analysis method to identify atherosclerotic plaque. It requires that the patient be given radioactive compounds.

The technique of the present invention is based on quite different principles and methods. In accordance with claim 1 the invention relates to fragments of apolipoprotein B for immunisation against cardiovascular disease as well as a method for diagnosing immuno reactions against peptide sequences of apolipoprotein B. Such immuno reactions have in turn showed to be increased in individuals having a developed atherosclerosis. The present technique is based in attaching peptide sequences in the bottom of polymer wells. When a blood sample is added the peptides will bind antibodies, which are specific to these sequences. The amount of antibodies bound is then determined using an immunological method/technique. In contrast to the technique of said US patent this is thus not a direct determination method to identify and localise atherosclerotic plaque but determines an

immunological response, which shows a high degree of co-variation with the extension of the atherosclerosis.

The basic principle of the present invention is thus quite different from that of said patent. The latter depends on binding of peptide sequences to the normal receptors of the lipoproteins present in atherosclerotic tissue, while the former is based on the discovery of immuno reactions against peptide sequences and determination of antibodies to these peptide sequences.

Published studies (Palinski et al., 1995, and George et al., 1998) have shown that immunisation against oxidised LDL reduces the development of atherosclerosis. This would indicate that immuno reactions against oxidised LDL in general have a protecting effect. The results given herein have, however, surprisingly shown that this is not always the case. E.g., immunisation using a mixture of peptides #10, 45, 154, 199, and 240 gave rise to an increase of the development of atherosclerosis. Immunisation using other peptide sequences, e.g., peptide sequences #1, and 30 to 34 lacks total effect on the development of atherosclerosis. The results are surprising because they provide basis for the fact that immuno reactions against oxidised LDL, can protect against the development, contribute to the development of atherosclerosis, and be without any effect at all depending on which structures in oxidised LDL they are directed to. These findings make it possible to develop immunisation methods, which isolate the activation of protecting immuno reactions. Further, they show that immunisation using intact oxidised LDL could have a detrimental effect if the particles used contain a high level of structures that give rise to atherogenic immuno reactions.

WO 99/08109 relates to the use of a panel of monoclonal mouse antibodies, which bind to particles of oxidised LDL in order to determine the presence of oxidised LDL in serum and plasma. This is thus totally different from the present invention wherein a method for determining antibodies against oxidised LDL is disclosed.

US patent 4,970,144 relates to a method for preparing antibodies by means of immunisation using peptide sequences, which antibodies can be used for the determination of apolipoproteins using ELISA. This is thus something further quite different from the present invention.

US patent 5,861,276 describes a recombinant antibody to the normal form of apolipoprotein B. This antibody is used for determining the presence of normal apolipoprotein B in plasma and serum, and for treating atherosclerosis by lowering the amount of particles of normal LDL in the circulation.

Thus in the present invention the use of antibodies are described for treating atherosclerosis. However, contrary to the US patent 5,861,276, these antibodies are directed to structures present in particles of oxidised LDL and not to the normal particle of LDL. The advantage is that it is the oxidised LDL, which is supposed to give rise to the development of atherosclerosis. The use of antibodies directed to structures being specific to oxidised LDL is not described in said US patent.

Summary of the invention

Oxidation of lipoproteins, mainly LDL, in the arterial wall is believed to be an important factor in the development of atherosclerosis. Products generated during oxidation of LDL are toxic to vascular cells, cause inflammation and initiate plaque formation. Epitopes in oxidized LDL are recognized by the immune system and give rise to antibody formation. Animal experiments have shown that some of these immune responses have a protective effect against atherosclerosis. Antibodies are generally almost exclusively directed against peptide-based structures. Using a polypeptide library covering the complete sequence of the only protein present in LDL, apolipoprotein B, the epitopes have been identified in oxidized LDL that give rise to antibody formation in man. These peptide-epitopes can be used to develop ELISAs to study associations between immune responses against oxidized LDL and cardiovascular disease and to develop an immunotherapy or anti-atherosclerosis "vaccine" for prevention and treatment of ischemic cardiovascular disease.

Detailed description of the invention

A molecular characterization of the epitopes in oxidized LDL has been performed that give rise to antibody-dependent immune responses in man. The approach used takes advantage of the fact that immune reactions almost exclusively are directed against 5-6 amino acid long peptide sequences. LDL only contains one protein, the 4563 amino acid long apolipoprotein B. During oxidation apolipoprotein B is fragmented and aldehyde adducts coupled to positively charged amino acids, in particularly lysine. This means that peptide sequences not normally exposed because of the three dimensional structure of apolipoprotein B become accessible to immune cells and/or that normally exposed peptide sequences becomes immunogenic because haptenization with aldehydes.

It has thereby been determined that the following peptides, native or MDA derivatives possess such an efficiency as producing an immuno-response, these peptides are

FLDTVYGNCSTHFTVKTRKG
PQCSTHILQWLKRVHANPLL
VISIPRLQAEARSEILAHWS

KLVKEALKESQLPTVMDFRK

LKFVTQAEGAKQTEATMTFK
DGSLRHKFLDSNIKFSHVEK
KGTYGLSCQRDPNTGRLNGE
RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ
SLTSTSDLQSGIIKNTASLK
TASLKYENYELTLKSDTNGK
DMTFSKQNALLRSEYQADYE
MKVKIIRTIDQMQNSELQWP

IALDDAKINFNEKLSQLQTY
KTTKQSFDLSVKAQYKKNKH

EEEMLENVSLVCPKDATRFK
GSTSHHLVSRKSISAALEHK
IENIDFNKSGSSTASWIQNV
IREVTQRLNGEIQALELPQK
EVDVLTKYSQPEDSLIPFFE

HTFLIYITELLKKLQSTTVM
LLDIANYLMEQIQDDCTGDE
CTGDEDYTYKIKRVIGNMGQ
GNMGQTMEQLTPELKSSILK
SSILKCVQSTKPSLMIQKAA
IQKAAIQALRKMEPKDKDQE
RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ
SLNSHGLELNADILGTDKIN
WIQNVDTKYQIRIQIQEKLQ
TYISDWWTLAAKNLTDFAEQ
EATLQRIYSLWEHSTKNHLQ

ALLVPPETEEAKQVLFLDTV
IEIGLEGKGFEPTLEALFGK
SGASMKLTTNGRFREHNAKF
NLIGDFEVAEKINAFRAKVH
GHSVLTAKGMALFGEGKAEF
FKSSVITLNTNAELFNQSDI
FPDLGQEVALNANTKNQKIR, as well as the non antibody-producing peptide
ATRFKHLRKYTYNYQAQSSS
or an active site of one or more of these peptides.

Material and Methods

To determine which parts of apolipoprotein B that become immunogenic as a result of LDL oxidation a polypeptide library consisting of 20 amino acid long peptides covering the complete human apolipoprotein B sequence was produced. The peptides were produced with a 5 amino acid overlap to cover all sequences at break points. Peptides were used in their native state, or after incorporation in phospholipid liposomes, after oxidization by exposure to copper or after malone dealdehyde (MDA)-modification to mimic the different modifications of the amino acids that may occur during oxidation of LDL.

Peptides

The 302 peptides corresponding to the entire human apolipoprotein B amino acid sequence were synthesized (Euro-Diagnostica AB, Malmö, Sweden and KJ Ross Petersen AS, Horsholm, Denmark) and used in ELISA. A fraction of each synthetic peptide was modified by 0.5 M MDA (Sigma-Aldrich Sweden AB, Stockholm, Sweden) for 3h at 37°C and in presence of liposomes by 0.5 M MDA for 3h at 37°C or by 5 µM $CuCl_2$ (Sigma) for 18 h at 37°C. The MDA-modified peptides were dialyzed against PBS containing 1 mM EDTA with several changes for 18 h at 4°C. The modification of the peptides was tested in denatured polyacrylamide gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), suitable for separation of peptides. Peptides were numbered 1-302 starting at the N-terminal end of the protein.

Other aldehydes can be used for preparing derivatives, such hydroxynonenal and others.

Liposomes

A mixture of egg phosphatidylcholine (EPC) (Sigma) and phosphatidylserine (PS) (Sigma) in a chloroform solution at a molar ratio of 9:1 and a concentration of 3mM phospholipid (PL) was evaporated in a glass container under gentle argon stream. The container was then placed under vacuum for 3 hours. A solution containing 0.10 mM peptide (5 ml) in sterile filtered 10 mM HEPES buffer pH 7.4, 145 mM NaCl and 0.003 % sodium azide was added to the EPC/PS dried film and incubated for 15 min at 50°C. The mixture was gently vortex for about 5 min at room temperature and then placed in ice-cold water bath and sonicated with 7.5 amplitude microns for 3 x 3 min (Sonyprep 150 MSE Sanyo, Tamro-Medlab, Sweden) with 1 min interruptions. The PL-peptide mixture, native or modified by 0.5 M MDA for 3h at 37°C or 5 mM $CuCl_2$ for 18 h at 37°C, was stored under argon in glass vials at 4°C wrapped in aluminum foil and used within 1 week. The MDA-modified mixture was dialyzed against PBS containing 1 mM EDTA with several changes for 18 h at 4°C before storage. The modification of the mixture was tested in denatured polyacrylamide gels (Bio-Rad Laboratories AB, Sundbyberg, Sweden), suitable for separation of peptides.

Plasma samples

Plasma samples from 10 patients with cardiovascular disease (AHP) and 50 plasma samples, 25 women and 25 men, from normal blood donors (NHP) were collected and pooled. The two pools were aliquoted and stored in −80°C.

ELISA

Native or modified synthetic peptides diluted in PBS pH 7.4 (20 µg/ml), in presence or absence of liposomes, were absorbed to microtiter plate wells (Nunc MaxiSorp, Nunc, Roskilde, Denmark) in an overnight incubation at 4°C. As a reference, one of the peptides (P6) was run on each plate. After washing with PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T) the coated plates were blocked with SuperBlock in TBS (Pierce, Rockford, IL) for 5 min at room temperature followed by an incubation of pooled human plasma, AHP or NHP, diluted 1/100 in TBS-0.05% Tween-20 (TBS-T) for 2 h at room temperature and then overnight at 4°C. After rinsing, deposition of auto-antibodies directed to the peptides were detected by using biotinylated rabbit anti-human IgG- or IgM-antibodies (Dako A/S, Glostrup, Denmark) appropriately diluted in TBS-T. After another incubation for 2 h at room temperature the plates were washed and the bound biotinylated antibodies were detected by alkaline phosphatase conjugated streptavidin (Sigma), incubated for 2 h at room temperature. The color reaction was developed by using phosphatase substrate kit (Pierce) and the absorbance at 405 nm was measured after 1h of incubation at room temperature. The absorbance values of the different peptides were divided with the absorbance value of P6 and compared.

The sequences in apolipoprotein B that were recognized by antibodies in human plasma are shown as Seq. Id 1-37 in the accompanying drawing. Both AHP and NHP contained antibodies to a large number of different peptides. Antibodies against both native and modified peptides were identified. Generally antibody titers to MDA modified peptides were higher or equal to that of the corresponding native peptide. Comparison between native, MDA-modified, copper-oxidized peptide showed a high degree of correlation and that the highest antibody titers were detected using MDA-modified peptides. The use of peptides incorporated into liposomes did not result in increased antibody levels. Antibodies of the IgM subclass were more common than antibodies of the IgG subtype.

The peptides against which the highest antibody levels were detected could be divided into six groups with common characteristics (Table 1):

(A) High levels of IgG antibodies to MDA-modified peptides (n=3).
(B) High levels of IgM antibodies, but no difference between native and MDA-modified peptides (n=9).
(C) High levels of IgG antibodies, but no difference between native and MDA-modified peptides (n=2).

(D) High levels of IgG antibodies to MDA-modified peptides and at least twice as much antibodies in the NHP-pool as compared to the AHP-pool (n=5).
(E) High levels of IgM antibodies to MDA-modified peptides and at least twice as much antibodies in the NHP-pool as compared to the AHP-pool (n=11)
(F) High levels of IgG antibodies, but no difference between intact and MDA-modified peptides but at least twice as much antibodies in the AHP-pool as compared to the NHP-pool (n=7).
(G) No level of IgG or IgM antibodies

Table 1

A. High IgG, MDA-difference

P 11.	FLDTVYGNCSTHFTVKTRKG
P 25.	PQCSTHILQWLKRVHANPLL
P 74.	VISIPRLQAEARSEILAHWS

B. High IgM, no MDA-difference

P 40.	KLVKEALKESQLPTVMDFRK
P 68.	LKFVTQAEGAKQTEATMTFK
P 94.	DGSLRHKFLDSNIKFSHVEK
P 99.	KGTYGLSCQRDPNTGRLNGE
P 100.	RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ
P 102.	SLTSTSDLQSGIIKNTASLK
P 103.	TASLKYENYELTLKSDTNGK
P 105.	DMTFSKQNALLRSEYQADYE
P 177.	MKVKIIRTIDQMQNSELQWP

C. High IgG, no MDA difference

P 143.	IALDDAKINFNEKLSQLQTY
P 210.	KTTKQSFDLSVKAQYKKNKH

D. NHS/AHP, IgG-ak > 2, MDA-difference

P1.	EEEMLENVSLVCPKDATRFK
P 129.	GSTSHHLVSRKSISAALEHK
P 148.	IENIDFNKSGSSTASWIQNV
P 162.	IREVTQRLNGEIQALELPQK
P 252.	EVDVLTKYSQPEDSLIPFFE

E. NHS/AHP, IgM-ak > 2, MDA-difference

P 301.	HTFLIYITELLKKLQSTTVM
P 30.	LLDIANYLMEQIQDDCTGDE

P 31. CTGDEDYTYKIKRVIGNMGQ
P 32. GNMGQTMEQLTPELKSSILK
P 33. SSILKCVQSTKPSLMIQKAA
P 34. IQKAAIQALRKMEPKDKDQE
P 100. RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ
P 107. SLNSHGLELNADILGTDKIN
P 149. WIQNVDTKYQIRIQIQEKLQ
P 169. TYISDWWTLAAKNLTDFAEQ
P 236. EATLQRIYSLWEHSTKNHLQ

F. NHS/AHP, IgG-ak < 0.5,no MDA-difference

P 10. ALLVPPETEEAKQVLFLDTV
P 45. IEIGLEGKGFEPTLEALFGK
P 111. SGASMKLTTNGRFREHNAKF
P 154. NLIGDFEVAEKINAFRAKVH
P 199. GHSVLTAKGMALFGEGKAEF
P 222. FKSSVITLNTNAELFNQSDI
P 240. FPDLGQEVALNANTKNQKIR

G.

P 2. ATRFKHLRKYTYNYQAQSSS

All of these 38 peptide sequences represents targets for immune reactions that may be of importance for the development of atherosclerosis and ischemic cardiovascular diseases. These peptides may therefor be used to develop ELISAs to determine the associations between antibody levels against defined sequences of MDA-modified amino acids in apolipoprotein B and risk for development of cardiovascular disease.

These peptides also represent possible mediators of the protective immunity observed in experimental animals immunized with oxidized LDL and may be used for testing in further development of an immunization therapy or "vaccine" against atherosclerosis.

Thus 38 different sequences in the human apolipoprotein B protein have been identified that give rise to significant immune responses in man. These epitopes are likely to represent what has previously been described as antibodies to oxidized LDL. Since most immune responses are directed against peptide sequences and apolipoprotein B is the only protein in LDL the approach used in this project should be able to identify the specific epitopes for essentially all antibodies against oxidized LDL-particles. A family of phospholipid specific antibodies including antibodies against cardiolipin has been described to react with oxidized LDL but the specificity and role of these antibodies remain to be fully characterized.

In many cases antibody titers were higher to MDA-modified polypeptides than to native sequences. If antibodies were detected against a MDA modified sequence it was almost always associated with presence of antibodies against the native sequence. A likely explanation to this is that the immune response against an MDA-modified amino acid sequence in apolipoprotein B (the MDA-modification occurring as a result of LDL oxidation) leads to a break of tolerance against the native sequence. For other sequences there was no difference in antibody titers against MDA-modified or native sequences. This would suggest that the immune reactions are directed against the native sequences. There should be no immune response against amino acid sequences in protein normally exposed to the immune system. In the native LDL particle large parts of the apolipoprotein B protein is hidden in phospholipid layer of LDL and therefore not accessible for the immune system. During oxidation of LDL the apolipoprotein B amino acid chain is fragmented leading to changes in the three-dimensional structure. This is likely to lead to exposure of peptide sequences normally not accessible for the immune system and to generation of antibodies against these sequences which may explain the presence of antibodies against native apolipoprotein B sequences observed. Alternatively, the true immune response is against MDA-modified sequences but the cross-reactivity with native sequences is so great that no difference in binding can be demonstrated.

Table 2.

Associations between antibodies to different peptides and atherosclerosis in the carotid artery assessed as intima/media thickness in 78 subjects (26 subjects who later developed myocardial infarction, 26 healthy controls and 26 high-risk individuals without disease).

Peptide	IgG		IgM	
	Native	MDA-modified	Native	MDA-modified
301				+
10			+	+
11			++	+
25	+	+	++	+++
30				++
31			++	[illegible]
32				[illegible]
33				+
34				+
45		++	++	+++
74	++	+	+	++
99				

100			+	++
102				
103			+	
105				
129			++	+++
143	+	+	++	+
148				+
154			+++	++
162			+	++
199				
210			+	
240			++	

+, r>0.2<0.3, p=<0.05; ++, r>0.3<0.4, p=0.01; +++, r>0.4, p=<0.001, grey, peptide antibody levels significantly increased in the group suffering from myocardial infarction.

The possibility that the ELISAs based on these peptides (native or MDA-modified) can be used to determine associations between immune reaction against defined epitopes in oxidized LDL and presence and/or risk for development of cardio-vascular disease was investigated in a pilot study. The study was performed on subjects participating in the Malmö Diet Cancer study a population based study in which over 30,000 individuals were recruited between 1989 and 1993. Antibody levels against the 24 out of 38 peptides listed in Table 1 were determined in base line plasma samples of 26 subjects who developed an acute myocardial infarction during the follow-up period and 26 healthy controls matched for age, gender and smoking. An additional group of 26 subjects, matched for age, gender, and smoking, but all with LDL cholesterol levels above 5.0 mmol/L was also included to study antibody levels in a high-risk group that has not developed cardiovascular disease.

For 19 out of the 24 peptides analyzed, significant correlations were identified between IgM antibody levels against MDA-modified peptides and the severity of atherosclerosis in the carotid artery (intima/media thickness) as assessed by ultrasound investigation of common carotid artery, i.e., the higher antibody levels the more atherosclerosis (Table 2). For many of these peptides significant correlations also existed between antibody levels to native peptides and carotid intima/media thickness. Only 4 peptides showed a significant correlation between IgG antibodies and carotid intima/media thickness. These observations suggest that ELISA using these MDA-modified peptides (alone or in combination) may be used to identify subjects with increased atherosclerosis.

Four of the peptides tested were not only associated with increased presence of atherosclerosis but were also significant elevated in the group of subjects that later suffered from a myocardial infarction (Table 2). Data for one of these peptides (peptide 240) is

shown in Fig. 7. These observations also demonstrate that peptide-based ELISA also may be used to identify subjects with an increased risk to develop myocardial infarction.

There were also significant increases in IgG antibody levels for native peptides 103, 162 and 199, as well as MDA modified 102 in the group that later suffered from myocardial infarction. However, the IgG antibodies against these peptides were not significantly associated with the presence of atherosclerosis in the carotid artery.

A particularly interesting observation was made with antibodies against MDA-modified peptide 210 for which there was significantly higher levels of IgM antibodies in the healthy controls and the high-risk group (LDL cholesterol above 5.0 mmol/L) than in the group that developed a myocardial infarction. Accordingly antibodies against MDA-modified peptide 210 may represent a marker for individuals with a decreased risk to develop cardiovascular disease.

It has now been demonstrated that immunization with native and MDA-modified apo B-100 peptide sequences results in an inhibition of atherosclerosis in experimental animals (Nordin Fredrikson, Söderberg et al, Chyu et al). The mechanisms through which these athero-protective immune responses operate remain to be fully elucidated. However, one likely possibility is that the athero-protective effect is mediated by antibodies generated against these peptides sequences. These antibodies could, for example facilitate the removal of oxidatively damaged LDL particles by macrophage Fc receptors.

Macrophage scavenger receptors only recognize LDL with extensive oxidative damage (9). Recent studies have identified the existence of circulating oxidized LDL (10,11). These particles have only minimal oxidative damage and are not recognized by scavenger receptors. Binding of antibodies to these circulating oxidized LDL particles may help to remove them from the circulation before they accumulate in the vascular tissue (12).

Several studies have supported a role for antibodies in protection against atherosclerosis. B cell reconstitution inhibits development of atherosclerosis in splenectomized apo E null mice (13) as well as neointima formation after carotid injury in RAG-1 mice (unpublished observations from our laboratory). Moreover, it has been shown that repeated injections of immunoglobulins reduce atherosclerosis in apo E null mice(6).

As discussed above antibodies against MDA-modified peptide sequences in apo B-100 may be generated by active immunization using synthetic peptides. This procedure requires 2-3 weeks before a full effect on antibody production is obtained.

In some situations a more rapid effect may be needed. One example may be unstable atherosclerotic plaques in which oxidized LDL is likely to contribute to inflammation, cell toxicity and risk for plaque rupture. Under these circumstances a passive immunization by injection of purified, or recombinantly produced antibodies against native and MDA-modified sequences may have a faster effect.

Another situation in which a passive immunization by injection of purified, or recombinantly produced antibodies may be effective is coronary heart disease in older individuals. Our studies have shown that a decrease in antibodies against apo B peptide sequences occurs with increasing age in man and is associated with an increase in the plasma level of oxidized LDL (Nordin Fredrikson, Hedblad et al). This may suggest a senescence of the immune cells responsible for producing antibodies against antigens in oxidized LDL and result in a defective clearance of oxidatively damaged LDL particles from the circulation. Accordingly, these subjects would benefit more from a passive immunization by injection of purified, or recombinantly produced antibodies than from an active immunization with apo B-100 peptide sequences.

Synthetic native peptides (Euro-Diagnostica AB, Malmö, Sweden) used in the following were peptide 1, 2 and 301 from the initially screened polypeptide library.
Peptide 1 (amino acid sequence: EEEMLENVSLVCPKDATRFK, n=10) and peptide 301 (amino acid sequence: HTFLIYITELLKKLQSTTVM, n=10) were found to have higher IgG or IgM antibody response to MDA modified form than native peptide, respectively and both titers are higher in healthy subject. These peptides were chosen based on the assumption that antibody response to these peptides might be protective against atherosclerosis.
Peptide 2 (amino acid sequence: ATRFKHLRKYTYNYQAQSSS, n=10) elicited no antibody response in the initial antibody screening, hence it was chosen as control peptide. Mice receiving Alum served as control (n=9).

Apo E (-/-) mice received subcutaneous primary immunization at 6-7 weeks of age, followed by an intra-peritoneal booster 3 weeks later. Mice were fed high cholesterol diet from the onset of immunization and continued until sacrifice at the age of 25 weeks. At the time of sacrifice, there was no significant difference in body weight among 4 groups of mice. Nor there was statistically significant difference in serum cholesterol as measured using a commercially available kit (Sigma). Their mean serum cholesterol levels were all above 715 mg/dl.

The area of the descending aorta covered by atherosclerotic plaque was measured in an *en face* preparation after oil red O staining. In comparison to the control group, mice immunized with peptide No.2 and No. 301 had substantially reduced atherosclerosis (Figure

2). Immunization with Peptide No 1 did not produce a significant reduction in atherosclerosis in comparison to control. In contrast to the descending aorta, extent of atherosclerosis in the aortic root and aortic arch did not differ among the 4 experimental groups (Figure 3).

There were no difference among 4 groups in terms of aortic sinus plaque size or its lipid content (Table A). Mean plaque sizes in the arotic arches from 4 groups of mice were not different. However, *en face* evaluation of plaque sizes from descending thoracic and abdominal aorta by oil red O staining revealed that control group and peptide No.1 group had similar amount of atherosclerotic plaque in the aorta, whereas peptide No.2 and No. 9 groups had a significantly reduced atherosclerotic burden in the aorta (Table A). The observation that peptide immunization did not affect aortic sinus or aortic arch plaque size but reduced descending aortic plaque is intriguing and suggests that peptide immunization might reduce new plaque formation but does not affect the progression of plaques.

It was further tested whether peptide immunization modulates the phenotype of atherosclerotic plaques. Frozen sections form aortic sinus plaques were immunohistochemically stained with monocyte/macrophage antibody (MOMA-2, Serotec). In concordance with the findings from *en face* observation, peptide No. 2 significantly reduced macrophage infiltration in the plaques (Figure 1). Trichrome staining revealed a mean collage content of 40.0±7.7% in the aortic sinus plaques from peptide 2 group; whereas mean collagen content in alum control group, peptide 1 group and peptide 9 group were 32.3±5.3%, 35.6±8.5% and 29.4±9.6%, respectively.

Antibody response against immunized peptide in each group was determined. Antibody titer after immunization increased 6.1±3.1 fold in peptide 1 group, 2.4±1.0 fold in peptide 2 group and 1.8±0.6 fold in peptide 9 group; whereas alum group had a 3.9±2.7 fold increase of antibody titer against peptide 1, 2.0±0.5 fold increase against peptide 2 and 2.0±0.9 fold increase against peptide 9. It is surprisinging the parallel increase of antibody titer against immunized peptides both in immunized and alum treated group. This may mean the following possibilities: (1) mechanism(s) other than humoral immune response (such as cellular immune response) may be involved in modulating atherosciserosis; or (2) this increase of antibody was a by-stander response to hypercholesterolemia with time.

Although there is no clear speculative mechanism to explain why peptide immunization reduced atheroscelerosis and/or modulate plaque phenotype, the novelty of this invention is the concept of using peptides of LDL as immunogen and its feasibility as an immunomodulation strategy. This peptide-based immunization strategy modulates atherosclerotic plaques. Immunization using homologous oxLDL or native LDL as antigen had been shown to reduce plaque size[1-3], however, the availability, production, infectious

contamination and safety of homologous human LDL make this approach unappealing for clinical application. Here it is demonstrated that peptide-based immunotherapy is feasible although our final results differ from our initial hypothesis that immunization using peptides with higher IgM or IgG antibody response in normal subjects may protect experimental animals from developing advanced atherosclerotic plaques.

It is surprising to find that immunization using peptide No. 2 protected animal from developing new atherosclerotic lesions in descending aorta and reduced macrophage infiltration and a higher collagen content in plaques since this peptide did not render any antibody response from initial human screen. It may be because (a) peptide No. 2 may be a part of human apo-B-100 protein structure that was not exposed to human immune system. Hence, no antibody was generated and detected from healthy human serum pools; (b) the amino acid sequence of peptide No. 2 is foreign to mice therefore mice developed immune response against this peptide, which modulates new atherosclerotic lesion formation and its phenotype.

The effect of homologous LDL immunization on plaque size varied when plaque sizes were evaluated at different portions of aortic tree. For example, Ameli et al showed in hypercholesterolemic rabbit native LDL immunization resulted in a reduction of plaque formation in aorta[1], whereas Freigang et al. showed reduction of plaque size in aortic sinus but not in aorta[2]. Taken their findings and the present ones together, it was speculated that peptide immunization modulates not only plaque sizes but also plaque composition. The plaque-reducing effect was only observed in descending aorta. Apo E (-/-) mice are known to develop atherosclerotic lesions at various stages of evolution in a single animal, especially when fed high cholesterol diet. The initial appearance of atherosclerotic lesion in young animal was in the aortic sinus[6,7] and after 15 weeks on high fat-high cholesterol diet lesions at aortic sinus were advanced plaques; whereas earlier stage of atherosclerosis was present in descending aorta.[6] Since the temporal course of plaque maturation and development in the descending aorta is late compared to that of aortic sinus, the finding that immunization reduced lesion sizes in the descending aorta but not in aortic sinus suggested immunization affects early stage of atherosclerosis formation. It is possible that as animal aged and in the presence of supra-physiological level of serum cholesterol the plaque reducing effect of immunization is overcome by the toxic effect of hypercholesterolemia. It is also possible that aortic sinus plaques mature faster and sacrifice at 25 weeks is too late to detect any difference in plaque size. Though lesion size was not modulated in the aortic sinus plaque, peptide immunization did modulate plaque compositions. The present experimental design prevented from studying the composition of the plaques in their earlier stage of development in descending aorta.

The experimental findings highlight the feasibility of using peptide sequences of LDL associated apo B-100 as immunogens for a novel approach to preventing atherosclerosis and or favorably modulating plaque phenotype despite severe hyperlipdemia. This peptide-based immunization strategy is potentially advantageous over the use of homologous oxLDL or native LDL as antigen because such a strategy could eliminate the need for isolation and preparation of homologous LDL and its attendant risks for contamination. The plaque-reducing effect of immunization with Peptide No 2 and 301 was only observed in descending aorta. These findings are consistent with previous reports where other therapeutic interventions have also been shown to have a greater effect on descending aorta compared to the aortic arch [14-17] , presumably because lesions develop more rapidly in the aortic root and the arch than the descending aorta thus creating a smaller window of opportunity for intervention [14, 15, 16, 18, 19]. Since the temporal course of plaque maturation and development in the descending aorta is late compared to that of aortic sinus and the aortic arch , the finding that immunization reduced lesion sizes in the descending aorta but not in aortic sinus and arch suggest that immunization preferentially prevents early stage of atherosclerosis formation. It is possible that as animal aged and in the presence of supra-physiological level of serum cholesterol the plaque reducing effect of immunization is overcome by the toxic effect of severe hypercholesterolemia. Though the lesion size was not modulated in the aortic sinus or arch, immunization with Peptide No 2 did modulate plaque composition in a favorable direction creating a more stable plaque phenotype with reduced macrophage infiltration and increased collagen content . In summary, it is demonstrated a novel peptide-based immunomodulatory approach for inhibition of atherosclerosis in the murine model.

In summary, it is demonstrated a novel peptide-based immunomodulatory approach in modulate atherosclerotic plaques. Although the change in ahterosclerosis formation in our model was only modest, yet this peptide-based immunization may provide an alternative tool in studying, preventing or treating atherosclerosis.

Methods

Peptide preparation. Peptides were prepared using Imject® SuperCarrier® EDC kit (Pierce, Rockford, IL) according to manufacturer's instruction with minor modification. One mg peptide in 500 μl conjugation buffer was mixed with 2 mg carrier in 200 μl deionized water. This mixture was then incubated with 1 mg conjugation reagent (EDC, 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide HCl) in room temperature for 2 hours. This was then dialyzed against 0.083 M sodium phosphate, 0.9 M sodium chloride pH 7.2 solution overnight at 4° C. The dialyzed conjugate was diluted with Imject dry blend purification buffer to a final volume of 1.5 ml. Alum was used as immunoadjuvant and mixed with peptide conjugate with 1:1 dilution in volume. The amount of peptide in each immunization was 33 μg/100 μl per injection.

Animal protocol. Apo E (-/-) mice from the Jackson Laboratories (Bar Harbor, Me) received subcutaneous primary immunization at 6-7 weeks of age, followed by an intra-peritoneal booster 3 weeks later. Mice were fed high cholesterol diet from the onset of immunization and continued until sacrifice at the age of 25 weeks. Blood samples were collected 2 weeks after booster and at the time of sacrifice. Mice receiving Alum served as control. Experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Cedars-Sinai Medical Center. All mice were housed in an animal facility accredited by the American Association of Accreditation of Laboratory Animal Care and kept on a 12-hour day/night cycle and had unrestricted access to water and food. At the time of sacrifice, mice were anesthetized by inhalation Enflurane. Plasma was obtained by retro-orbital bleeding prior to sacrifice.

Tissue harvesting and sectioning. To evaluate the effect of peptide immunization on atherosclerosis formation, the plaque size at aortic sinus was assessed, aortic arch and descending thoracic and abdominal aorta. After the heart and aortic tree were perfused with normal saline at physiological pressure, the heart and proximal aorta were excised and embedded in OCT compound (Tissue-Tek) and frozen sectioned. Serial 6-μm-thick sections were collected from the appearance of at least 2 aortic valves to the disappearance of the aortic valve leaflets for aortic sinus plaque evaluation. Typically 3 consecutive sections were on one slide and a total of 25-30 slides were collected from one mouse and every fifth slide was grouped for staining. Ascending aorta and aortic arches upto left subclavian artery were also sectioned and processed similarly. Descending thoracic and abdominal aorta were processed separately for *en face* evaluation of plaque formation after oil red O staining. *En face* preparation of descending thoracic and abdominal aorta

Chicken egg albumin (Sigma) in a concentration of 0.8 g/ml water was mixed 1:1 with glycerol. Sodium azide was added to make a final concentration of sodium azide 0.2%. After descending thoracic and abdominal aorta was cleaned off surrounding tissue and fat, the segment of aorta from left subclavian artery to the level of renal artery was then carefully removed for overnight fixation in Histochoice (Amresco). Aorta was then carefully opened longitudinally and placed with luminal side up on a slide freshly coated with egg albumin solution. After albumin solution became dry, the aorta was stained with Oil red O to assess the extent of atherosclerosis with computer-assisted histomorphometry.

Immunohistochemistry and Histomorphometry. The sections from aortic sinus were immunohistochemically stained with MOMA-2 antibody (Serotec) using standard protocol. Trichrome stain to assess collagen content and oil red O stain for plaque size and lipid content were done using standard staining protocol. Computer-assisted morphometric analysis was performed to assess histomorphometry as described previously.[8]

Antibody titer measurement. To measure the antibody response after peptide immunization, an ELISA was developed. Antibody titer against immunized peptide was measured using blood collected at 2 weeks after booster and at sacrifice. Antibody response against 3 peptides was also determined in Alum group at the same time-points. In brief, native synthetic peptides diluted in PBS pH 7.4 (20 µg/ml) were absorbed to microtiter plate wells (Nunc MaxiSorp, Nunc, Roskilde, Denmark) in an overnight incubation at 4 °C. After washing with PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T) the coated plates were blocked with SuperBlock in TBS (Pierce) for 5 min at room temperature followed by an incubation of mouse serum diluted 1/50 in TBS-0.05% Tween-20 (TBS-T) for 2 h at room temperature and then overnight at 4 °C. After rinsing, deposition of antibodies directed to the peptides was detected by using biotinylated rabbit anti-mouse Ig antibodies (Dako A/S, Glostrup, Denmark) appropriately diluted in TBS-T. After another incubation for 2 h at room temperature the plates were washed and the bound biotinylated antibodies were detected by alkaline phosphatase conjugated streptavidin (Sigma), incubated for 2 h at room temperature. Using phosphatase substrate kit (Pierce) developed the colour reaction and the absorbance at 405 nm was measured after 1h of incubation at room temperature. Mean values were calculated after the background was subtracted.

Other assay models is of course applicable as well, such any immunoassay detecting an antibody, such as radioactive immunoassay, Western blotting, and Southern blotting, as well as detection of antibodies bound to peptides, enzyme electrodes and other methods for analysis.

Statistics

Data are presented as mean ± Std. Statistical method used is listed in either text, table or figure legend. $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Table A Aortic sinus plaque size and its lipid content, aortic arch plaque size and percent of plaque in descending aorta.

	Total plaque size in aortic sinus (mm^2)	Oil red O (+) area (% of aortic sinus plaque)	Aortic arch plaque size (mm^2)	% of plaque aorta (flat pre
Alum	0.49±0.13	21.7±4.4	0.057±0.040	20±4.7
Peptide 1	0.48±0.14	32.0±8.1	0.054±0.027	17±4.3
Peptide 2	0.52±0.12	23.9±3.5	0.078±0.022	6.3±1.9*
Peptide 301	0.46±0.16	23.8±4.1	0.050±0.024	8.9±2.2*

* Significant different from Alum group. ANOVA followed by Tukey-Kramer test was used for statistical analysis.

Further data on the effect of immunization with apolipoprotein B-100 peptide sequences on atherosclerosis in apo E knockout mice is given below in Table B

Table B

Effect of immunization with apolipoprotein B-100 peptide sequences on atherosclerosis in apo E knockout mice

Immunizations using mixtures of several peptide sequences

	Effect on atherosclerosis in the aorta
1. Peptide sequences 143 and 210	-64.6%
2. Peptide sequences 11, 25 and 74	-59.6%
3. Peptide sequences 129, 148 and 167	-56,8%
4. Peptide sequences 99, 100, 102, 103 and 105	-40.1%
5. Peptide sequences 30, 31, 32, 33 and 34	+6.6%
6. Peptide sequences 10, 45, 154, 199 and 240	+17.8%

Immunizations using a single peptide sequence

1. Peptide sequence 2	-67.7%
2. Peptide sequence 210	-57.9%
3. Peptide sequence 301	-55,2%
4. Peptide sequence 45	-47.4%
5. Peptide sequence 74	-31.0%
6. Peptide sequence 1	-15.4%
7. Peptide sequence 240	0%

Administration of the peptides is normally carried by injection, such as subcutaneous injection, intravenous injection, intramuscular injection or intraperitoneal injection. A first immunizing dosage can be 1 to 100 mg per patient depending on body weight, age, and other physical and medical conditions. In particular situations a local administration of a solution containing one or more of the peptides via catheter to the coronary vessels is possible as well. Oral preparations may be contemplated as well, although particular precautions must be taken to admit absorption into the blood stream. An injection dosage may contain 0.5 to 99.5 % by weight of one or more of the fragments or peptides of the present invention.

The peptides are normally administered as linked to cationized bovine serum albumine, and using aluminum hydroxide as an adjuvant. Other adjuvants known in the art can be used as well.

Solutions for administration of the peptides shall not contain any EDTA or antioxidants.

The peptides can also be used as therapeutic agents in patients already suffering from an atheroschlerosis. Thus any suitable administration route can be used for adding one or more of the fragments or peptides of the invention.

Initial studies focused on determining which type of oxidative modifications of peptides led to recognition by antibodies in human plasma. These studies were done using peptides 1-5 and 297-302. During oxidation of LDL polyunsaturated fatty acids in phospholipids and cholesteryl esters undergo peroxidation leading to formation of highly reactive breakdown products, such as malondealdehyde (MDA). MDA may then form covalent adducts with lysine and histidine residues in apo B-100 making them highly immunogenic. Oxidation of LDL also results in fragmentation of apo B-100 that may lead to exposure of peptide sequences not normally accessible for the immune system. In these experiments peptides were used in their native state, after MDA modification or after incorporation into phospholipid liposomes followed by copper oxidation or MDA-modification. IgM antibodies were identified against native, MDA- and liposome oxidized peptides, with antibody titers MDA-peptide>MDA-modified liposome peptides>liposome oxidized peptide>native peptide. Specificity testing demonstrated that binding of antibodies to MDA-modified peptides was competed by both MDA-LDL and copper oxidized LDL.

We then performed a screening of the complete peptide library using pooled plasma derived from healthy control subjects and native and MDA-modified peptides as antigens. Antibodies to a large number of sites in apo B-100 were identified. Using twice the absorbance of the background control as positive titer cut off, antibodies were detected against 102 of the 302 peptides constituting the complete apo B-100 sequence. IgM binding was substantially more abundant than that of IgG. Generally, binding was higher to MDA modified peptide sequences than to the corresponding native sequence, but these was a striking correlation between the two. Binding to both native and MDA modified sequences was competed by addition of MDA-modified LDL and copper oxidized LDL, but not by native LDL. These observations suggest that immune responses against MDA-modified peptide sequences in apo B-100 results in a cross reactivity against native sequences. The inability of native LDL to compete antibody binding to native apo B-100 peptide sequences is intriguing, but may indicate that these sequences only become exposed after the proteolytic degradation of apo B-100 that occurs as a result of LDL oxidation. Both hydrophilic and hydrophobic parts of the molecule were recognized by antibodies. A second screening of the apo B-100 peptide

library was performed using pooled plasma from subjects with clinical signs of coronary heart disease (CHD, acute myocardial infarction (AMI) and unstable angina; *n*=10). Antibodies in pooled CHD plasma bound to the same sequences and with the same overall distribution as for antibodies in healthy control plasma. However, antibody titers to several peptides (#1, 30-34, 100, 107, 148, 149, 162, 169, 236, 252 and 301) were at least twice as high as in control plasma compared to plasma from CHD subjects, whereas titers against a few peptides (#10, 45, 111, 154, 199, 222 and 240) were higher in plasma from CHD patients compared to controls. We then performed a prospective clinical study to investigate if antibody levels against MDA-modified peptide sequences in apo B-100 predict risk for development of CHD. Using a nested case control design we selected 78 subjects with coronary events (AMI or death due to CHD) and 149 controls from the Malmö Diet Cancer Study. Neither cases nor control individuals had a history of previous MI or stroke. The median time from inclusion to the acute coronary event was 2.8 years (range 0.1-5.9 years) among cases. Antibody levels were determined in baseline plasma samples supplemented with antioxidants. Using the carotid intima-media thickness (IMT) as assessed by ultrasonography at baseline we also analyzed associations between antibody levels and degree of existing vascular disease. We studied 8 MDA-modified peptide sequences that in the initial screening studies were associated with high plasma antibody levels (# 74, 102 and 210) and/or marked differences between control and CHD plasma pools (# 32, 45, 129, 162 and 240). Controls were found to have higher IgM levels against MDA peptide 74 (0.258, range 0-1.123 absorbance units versus 0.178, range 0-0.732 absorbance units, $p<0.05$), otherwise there were no differences in antibody levels between cases and controls. Associations between IMT and IgM against MDA-peptides # 102, 129, and 162 ($r \approx 0.233$, 0.232, and 0.234, respectively, $p<0.05$) were observed in cases and between IMT and MDA-peptide 45 ($r=0.18$, $p<0.05$) in controls. Weak correlations were observed between antibodies to MDA peptide 129 and total and LDL cholesterol ($r=0.19$ and $r=0.19$, $p<0.01$, respectively), otherwise peptide antibody levels showed no associations with total plasma cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol or plasma triglycerides. There were strong co-variations between antibody levels to the different peptides (r values ranging from 0.6 to 0.9). The only exception was antibodies against MDA-peptide 74 that were weakly or not at all related to antibodies against the other peptides.

Antibodies against all sequences except MDA-peptide 74 was inversely associated with age among cases (r values ranging from -0.38 to -0.58, $p<0.010.001$), but not in controls. Plasma levels of oxidized LDL, in contrast, increased with age. Again this association was stronger in cases than in controls. To investigate if the associations between immune responses against MDA-modified peptide sequences and cardiovascular disease were different in different age groups a subgroup analysis was performed on cases and controls under and above the median age (61 years). In the younger age group cases had increased antibody levels against peptides 32 and 45 and decreased antibody levels against peptide 74

as compared to controls, whereas no differences were seen in the older age group. Antibodies against all MDA peptide sequences, except peptide 74, were significantly associated with IMT in the younger age group, but not in the older (Table).

These studies identify a number of MDA-modified sequences in apo B-100 that are recognized by human antibodies. MDA-modification of apo B-100 occurs as a result of LDL oxidation indicating that these antibodies belong to the family of previously described oxidized LDL autoantibodies. This notion is also supported by the observation that antibody binding to MDA-modified apo B-100 peptides is competed by addition of oxidized LDL. Together with the oxidized phospholipids identified by Hörkkö et al, these MDA-modified peptide sequences are likely to constitute the large majority of antigenic structures in oxidized LDL. In similarity with the oxidized LDL antiphospholipid antibodies, antibodies against MDA-modified apo B-100 sequences were of IgM type. This may suggest that also the latter antibodies belong to the family of T 15 natural antibodies. T 15 antibodies have been attributed an important role in the early, T cell independent defence against bacterial infections as well as in the removal of apoptotic cells. It remains to be determined if the MDA-peptide antibodies described here have similar functions. Antibodies were also identified against a large number of native apo B-100 sequences. However, the striking co-variation between antibodies to native and MDA-modified sequences suggests that also these antibodies are formed in response to LDL oxidation. It is also possible that antibodies against an MDA-modified peptide sequence cross reacts with the corresponding native sequence. If antibodies against native apo B-100 sequences bind also to native LDL particles this is likely to have a major influence on LDL metabolism. However, the finding that native LDL does not compete antibody binding to native apo B-100 sequences, as well as the lack of correlation between antibodies against native apo B-100 sequences and LDL cholesterol levels against the existence of such a phenomena.

Antibodies against MDA-modified peptide sequences decreased progressively with age in the cases, but not in the controls. With the exception of MDA-peptide 74, IgM antibodies against MDA-peptides were significantly associated with carotid IMT in the younger age group (below 62 years), but not in the older age group. These findings suggest that significant changes in the interactions between the immune system and the atherosclerotic vascular wall takes place between ages 50 and 70 years. One possibility is that in younger individuals the atherosclerotic disease process is at a more active stage with a more prominent involvement of immune cells. Another possibility is that the decreased levels of antibodies against MDA-modified peptide sequences in older subjects reflect a senescence of the immune cells involved in atherosclerosis. An impaired function of immune cells due to immunosenescence have been proposed to contribute to an increased susceptibility to infection and cancer in the older population. Interestingly, immunosenescence is inhibited by antioxidants indicating involvement of oxidative stress. Immune cells that interact with

epitopes in oxidized LDL are likely to be particularly exposed to oxidative stress. Since oxidized LDL is present in arteries already at a very early age these immune response are being continuously challenged for several decades, which may further contribute to a development of immunosenescence.

Increased antibodies against two sites in apo B-100 were found to predict risk for myocardial infarction and coronary death in subjects below 62 years of age. Antibodies against these sites showed a high level of co-variation suggesting that they were produced in response to the same underlying pathophysiological processes. The fact that the median time from blood sampling to coronary event was only 2.8 years makes these antibodies particularly interesting as makers for increased CHD risk. Antibody levels against MDA-modified apo B-100 peptide sequences showed no associations with other CHD risk factors such as hyperlipidemia, hypertension and diabetes suggesting that they are independent markers of CHD risk. The CHD cases in the present study were not extremely high-risk individuals and in this respect representative of the common CHD patient. The finding that IgM against MDA-modified apo B-100 sequences predicts short-term risk for development of acute coronary events in individuals that would not have been identified as high risk by screening of established risk factors suggest that it may become a useful instrument in identifying individuals in need of aggressive preventive treatment. However, considerably larger prospective studies with multivariate analysis are required before the clinical value of determining antibodies against apo B-100 MDA-modified peptide sequences can be fully established. Another limitation of the present clinical study is that we have only analysed antibodies against a small number of the antigenic sites in apo B-100 and that antibody titers against other sites may be even better markers of cardiovascular risk.

In subjects below age 60 antibodies against a large number of MDA-modified sites in apo B-100 were correlated with the extent of existing vascular disease as assessed by carotid IMT. IgM antibodies were more closely associated with carotid IMT than IgG antibodies. Although carotid IMT has obvious limitations as a measure of general atherosclerotic burden these observations still suggest that determination of IgM against MDA-modified sequences in apo B-100 may be one method to assess the severity of existing atherosclerosis. These observations are also in line with several previous studies that have reported associations between coronary and carotid artery disease and IgM antibodies against oxidized LDL.

Antibodies against peptide 74 differed against other apo B-100 peptide antibodies in many respect. They were higher in controls than in cases, they did not decrease with age and were not associated with the extent of carotid disease. Accordingly, antibodies against this peptide sequence represent interesting candidates for an athero-protective immune response.

An important question is why these associations occur. They clearly demonstrate that immune responses against MDA-modified apo B-100 sites somehow are involved in the atherosclerosic disease process. Since high antibody levels are associated with more severe atherosclerosis and increased risk for development of acute coronary events one obvious possibility is that these immune responses promote atherogenesis. Studies demonstrating that immune responses against heat shock proteins, such as HSP 65, are atherogenic provide some support for this notion. However, experimental animal studies have shown an athero-protective effect of oxidized LDL immunization. B cell reconstitution of spleen ectomized apo E null mice results in a decrease in atherosclerosis. Reduced atherosclerosis has also been observed in apo E null mice given repeated injections of immunoglobulin. The present observations do not necessarily argue against an athero-protective role of immune responses against oxidized LDL. These immune responses are activated by pro-atherogenic processes such as LDL oxidation. Accordingly, they are also likely to be in proportion to the severity of the disease process and could serve as makers of disease severity and CHD risk without contributing to disease progression. The finding that immunization of apo E null mice with apo B-100 peptide sequences inhibits development of atherosclerosis reported in two accompanying papers demonstrates that this is likely to be the case. Indeed, the most important outcome of the present study may well be the identification of structures that could be used as components of a vaccine against atherosclerosis. The observation that the decrease in antibodies against MDA-modified peptide sequences in apo B-100 that occurs with age is accompanied by an increase in plasma levels of oxidized LDL suggest that an increased clearance of minimally oxidized LDL from the circulation may be one mechanism by which these antibodies could protect against atherosclerosis.

Methods

Study population

The study subjects, borr between 1926-45, belong to the Malmö "Diet and Cancer (MDC)" study cohort. A random 50% of those who entered the MDC study between November 1991 and February 1994 were invited to take part in a study on the epidemiology of carotid artery disease. Routines for ascertainment of information on morbidity and mortality following the health examination, as well as definition of traditional risk factors, have been reported.

Eighty-five cases of acute coronary heart events, i.e. fatal or non-fatal MI or deaths due to coronary heart disease (CHD) were identified. Participants who had a history of myocardial infarction or stroke (n=6) were not eligible for the present study. For each case two controls without a history of myocardial infarction or stroke was individually matched for age, sex, smoking habits, presence of hypertension and month of participation in the screening examination and duration of follow-up. Due to logistic reason (blood samples were not available in sufficient quantity for assessment of peptides) only one control was available for seven cases and no controls for one case. This case was excluded from analysis. Thus the

study population consists of 227 subjects, 78 cases and 149 controls, aged 49-67 (median 61) years at baseline.

Laboratory analyses

After overnight fasting blood samples were drawn for the determination of serum values of total cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol, LDL cholesterol and whole blood glucose. LDL cholesterol in mmol/L was calculated according to the Friedewald formula. Oxidized LDL was measured by ELISA (Mercordia).

B-mode ultrasound vasculography

An Acuson 128 Computed Tomography System (Acuson, Mountain View, California) with a MHz transducer was used for the assessment of carotid plaques in the right carotid artery as described previously.

Development of ELISAs against apo B-100 peptide sequences

The 302 peptides corresponding to the entire human apolipoprotein B amino acid sequence were synthesized (Euro-Diagnostica AB, Malmö, Sweden and KJ Ross Petersen AS, Horsholm, Denmark) and used in ELISA. A fraction of each synthetic peptide was modified by 0.5 M MDA (Sigma-Aldrich Sweden AB, Stockholm, Sweden) for 3h at 37°C and in presence of liposomes by 0.5 M MDA for 3h at 37°C or by 5 mM $CUC1_2$ (Sigma) for 18 h at 37°C. The MDA modified peptides were dialysed against PBS containing 1 mM EDTA with several changes for 18 h at 4°C. The modification of the peptides was tested in denatured polyacrylamide gels (BioRad Laboratories, Hercules, CA), suitable for separation of peptides.

A mixture of egg phosphatidylcholine (EPC) (Sigma) and phosphatidylserine (PS) (Sigma) in a chloroform solution at a molar ratio of 9:1 and a concentration of 3mM phospholipid (PL) was evaporated in a glass container under gentle argon stream. The container was then placed under vacuum for 3 hours. A solution containing 0.10 mM peptide (5 ml) in sterile filtered 10 mM HEPES buffer pH 7.4, 145 mM NaCl and 0.003 % sodium azide was added to the EPC/PS dried film and incubated for 15 min at 50°C. The mixture was gently vortex for about 5 min at room temperature and then placed in ice-cold water bath and sonicated with 7.5 amplitude microns for 3 x 3 min (Sonyprep 150 MSE Sanyo, Tamro-Medlab, Sweden) with 1 min interruptions. The PL-peptide mixture, native or modified by 0.5 M MDA for 311 at 37°C or 5 mM $CUC1_2$ for 18 h at 37 °C, was stored under argon in glass vials at 4 °C wrapped in aluminum foil and used within 1 week. The MDA-modified mixture was dialyzed against PBS containing 1 mM EDTA with several changes for 18 h at 4 °C before storage. The modification of the mixture was tested in denatured polyacrylamide gels (BioRad Laboratories AB; Sundbyberg, SE), suitable for separation of peptides.

Native or modified synthetic peptides diluted in PBS pH 7.4 (20 leg/ml), in presence or absence of liposomes, were absorbed to microtiter plate wells (Nunc MaxiSorp, Nunc, Roskilde, Denmark) in an overnight incubation at 4 °C. As a reference, one of the peptides (P6) was ran on each plate. After washing with PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T) the coated plates were blocked with SuperBlock in TBS (Pierce, Rockford, IL) for 5 min at room temperature followed by an incubation of pooled human plasma, diluted 1/100 in TBS-0.05% Tween-20 (TBS-T) for 2 h at room temperature and then overnight at 4°C. After rinsing, deposition of auto-antibodies directed to the peptides were detected by using biotinylated rabbit anti-human IgG- or IgM-antibodies (Dako A/S, Glostrup, Denmark) appropriately diluted in TBS-T. After another incubation for 2 h at room temperature the plates were washed and the bound biotinylated antibodies were detected by alkaline phosphatase conjugated streptavidin (Sigma), incubated for 2 h at room temperature. The color reaction was developed by using phosphatase substrate kit (Pierce) and the absorbance at 405 nm was measured after ih of incubation at room temperature. The absorbance values of the different peptides were divided with the absorbance value of P6 and compared.

Statistics

SPSS was used for the statistical analyses. The results are presented as median and range and as proportions when appropriate. Boxplot and scatterplots were used till illustrate the relationship between age and selected peptides among cases and corresponding controls. Corresponding graphs were also used to illustrate the relationship between age and selected peptides, cases and controls, respectively, below and above the median age (61 year) at baseline and separately for cases and controls below the median age. In cases and controls, separately, partial correlation coefficients, adjusted for age and sex, were computed between selected peptides and blood lipid levels and common carotid IMT. Age- and sex adjusted partial correlation coefficients were also computed between common carotid IMT and selected peptides in cases and controls below and over the median age. An independent sample t-test was used to assess normally distributed continuous variables and a Chi-square test for proportions between cases and controls. Non-parametric test (Mann-Whitney) was used to assess non-normally distributed continuous variables between cases and controls. All p-values are two-tailed.

Table

Age- and sex adjusted correlation coefficient for different baseline MDA peptides and common carotid artery intima-media thickness among younger (49-61 years) and older (62-67 years) cases with myocardial infarction and their corresponding controls matched for age, sex, smoking and hypertension.

PEPTIDE	CASES plus CONTROLS Aged 49-61 year, n = 116	CASES plus CONTROLS Aged 62-67 year, n =111
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

REFERENCES

1. Ameli S *et al*. Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 16,1074-1079 (1996)
2. Freigang S, Hörkkö 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 titlers of antibodies to oxidative neoepitopes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 18,1972-1982 (1998)
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)
4. Alving C.R. et al. Immunization with cholesterol-rich liposomes induces anti-cholesterol antibodies and reduces diet-induced hypercholestgerolemia and plaque formation. *J. Lab. Clin. Med*. 127,40-49 (1996)
5. Zhou 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*. 21,108-114 (2001)
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)
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)
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)
9. Glass, C.K. & Witztum, J.L. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* 104, 503-16. (2001).
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).
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).
12. Krych-Goldberg, M. & Atkinson, J.P. Structure-function relationships of complement receptor type 1. *Immunol Rev* 180, 112-22. (2001).

13. Nicoletti, A., Caligiuri, G., Paulsson, G. & Hansson, G.K. Functionality of specific immunity in atherosclerosis.
Am Heart J 138, S438-43 (1999).

16. Chobanian, A.V., Haudenschild, C.C., Nickerson, C. & Drago, R. Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit.
Hypertension 15, 327-31. (1990).

17. Inoue, I. et al. Macrophage colony stimulating factor prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.
Atherosclerosis 93, 245-54. (1992).

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 U S A 93, 10022-7. (1996).

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).

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).

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).

FIGURE LEGENDS

Figure 1-6 show antibody response to the different peptides prepared in accordance with the present invention.

CLAIMS

1. Fragments of apo-lipoprotein B intended for immunization or therapeutic treatment of mammals, including humans, against ischemic cardiovascular diseases and having immunogenic or therapeutic properties against ischemic cardiovascular diseases, and/or diagnosing the presence or absence of antibodies related to increased or decreased risk of developing ischemic cardiovascular diseases.

2. Fragments according to claim 1, wherein the fragments are haptens of aldehydes.

3. Fragments according to claim 2, wherein the ftragments are modified using malone dealdehyde or hydroxynonenal.

4. Peptides being fragments according to claims 1-3, native or as aldehyde-derivatives comprising the group

FLDTVYGNCSTHFTVKTRKG
PQCSTHILQWLKRVHANPLL
VISIPRLQAEARSEILAHWS

KLVKEALKESQLPTVMDFRK
LKFVTQAEGAKQTEATMTFK
DGSLRHKFLDSNIKFSHVEK
KGTYGLSCQRDPNTGRLNGE
RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ
SLTSTSDLQSGIIKNTASLK
TASLKYENYELTLKSDTNGK
DMTFSKQNALLRSEYQADYE
MKVKIIRTIDQMQNSELQWP

IALDDAKINFNEKLSQLQTY
KTTKQSFDLSVKAQYKKNKH

EEEMLENVSLVCPKDATRFK
GSTSHHLVSRKSISAALEHK
IENIDFNKSGSSTASWIQNV
IREVTQRLNGEIQALELPQK
EVDVLTKYSQPEDSLIPFFE
HTFLIYITELLKKLQSTTVM
LLDIANYLMEQIQDDCTGDE
CTGDEDYTYKIKRVIGNMGQ
GNMGQTMEQLTPELKSSILK

SSILKCVQSTKPSLMIQKAA
IQKAAIQALRKMEPKDKDQE
RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ
SLNSHGLELNADILGTDKIN
WIQNVDTKYQIRIQIQEKLQ
TYISDWWTLAAKNLTDFAEQ
EATLQRIYSLWEHSTKNHLQ

ALLVPPETEEAKQVLFLDTV
IEIGLEGKGFEPTLEALFGK
SGASMKLTTNGRFREHNAKF
NLIGDFEVAEKINAFRAKVH
GHSVLTAKGMALFGEGKAEF
FKSSVITLNTNAELFNQSDI
FPDLGQEVALNANTKNQKIR

ATRFKHLRKYTYNYQAQSSS
or an active site of one or more of these peptides.

5. A peptide according to claim 3, selected from the group
HTFLIYITELLKKLQSTTVM
ALLVPPETEEAKQVLFLDTV
FLDTVYGNCSTHFTVKTRK
PQCSTHILQWLKRVHANPLL
LLDIANYLMEQIQDDCTGDE
CTGDEDYTYKIKRVIGNMGQ
GNMGQTMEQLTPELKSSILK
SSILKCVQSTKPSLMIQKAA
IQKAAIQALRKMEPKDKDQE
IEIGLEGKGFEPTLEALFGK
VISIPRLQAEARSEILAHWS
KGTYGLSCQRDPNTGRLNGE
RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ
SLTSTSDLQSGIIKNTASLK
TASLKYENYELTLKSDTNGK
DMTFSKQNALLRSEYQADYE
GSTSHHLVSRKSISAALEHK
IALDDAKINFNEKLSQLQTY
IENIDFNKSGSSTASWIQNV
NLIGDFEVAEKINAFRAKVH

IREVTQRLNGEIQALELPQK
GHSVLTAKGMALFGEGKAEF
KTTKQSFDLSVKAQYKKNKH
FPDLGQEVALNANTKNQKIR
ATRFKHLRKYTYNYQAQSSS
or an active site of one or more of these peptides.

6. Peptide according to claims 4-5, in native form.

7. Peptide according to claims 4-5, in oxidized form.

8. Peptide according to claim 7, wherein the peptide has been oxidized using copper.

9. Peptide according to claims 4-5, wherein the peptide is present in a combination with phospholipid liposomes.

10. Peptide according to claims 4-5, in the form of a malone dealdehyde (MDA) derivative thereof.

11. Peptide according to claims 4-5, in the form of a hydroxynoneal-derivative thereof.

12. The use of one or more of the fragments/peptides of claims 1 to 11, in native or MDA or hydroxynoneal derivative form, in the preparation of pharmaceutical compositions intended for immunotherapy or therapy for the treatment of ischemic cardiovascular diseases, optionally in combination with an adjuvant.

13. Use according to claim 12, wherein an immunization dose is 1 to 100 mg of the fragments/peptides.

14. Pharmaceutical preparation comprising a therapeutically effective amount of one or more of the fragments/peptides of claims 1-11, optionally in combination with one or more pharmaceutically innocuous fillers, and/or adjuvants.

15. Pharmaceutical preparation according to claim 14, wherein the fragments/peptides are present as linked to cationized bovine serum albumine, and using aluminum hydroxide as an adjuvant.

16. Pharmaceutical composition according to claim 15, wherein the composition is present as an injectable composition.

17. Vaccine for immunization of mammals, including humans, against ischemic cardiovascular diseases comprising one or more fragments/peptides of claims 1-11, optionally in combination with an adjuvant

18. Vaccine for immunization of mammals, including humans, against ischemic cardiovascular diseases comprising a therapeutically effective amount of purified or recombinantly produced antibodies against one or more of said native and/or MDA modified sequences of claims 1-11.

19. Vaccine for immunization according to claim 17, wherein the fragments/peptides present for immunization are present as linked to cationized bovine serum albumine, and using aluminum hydroxide as an adjuvant.

20. Method of prophylactic or therapeutic treatment of a mammal, including a human being, suffering from atheroschlerosis or facing the risk of developing ischemic cardiovascular diseases, whereby a therapeutically effective amount of one or more of the fragments and/or peptides of claims 1-11, either in native form or in the form of a malone dealdehyde or a hydroxynoneal derivative, is administered to said mammal suffering from atheroschlerosis, or facing the risk of developing ischemic cardiovascular diseases, in particular myocardial infarction.

21. Method of prophylactic or therapeutic treatment of a mammal, including a human being, suffering from atheroschlerosis or facing the risk of developing ischemic cardiovascular diseases, whereby a therapeutically effective amount of one or more of purified, or recombinantly produced antibodies against native and MDA-modified sequences to produce a passive immunization is administered.

22. Method according to claim 20, wherein the conditions are one or more of unstable atherosclerotic plaques in which oxidized LDL is likely to contribute to inflammation, cell toxicity and risk for plaque rupture, as well as coronary heart disease in older individuals.

23. Method of diagnosing the presence or absence of antibodies related to increased or decreased risk of developing ischemic cardiovascular diseases, using one or more of the fragments and/or peptides of claims 1-11 in an assay.

24. Method according to claim 23, wherein the assay is an immunoassay.

25. Method according to claim 24, wherein the immunoassay is an ELISA, RIA, Western blotting, Southern blotting

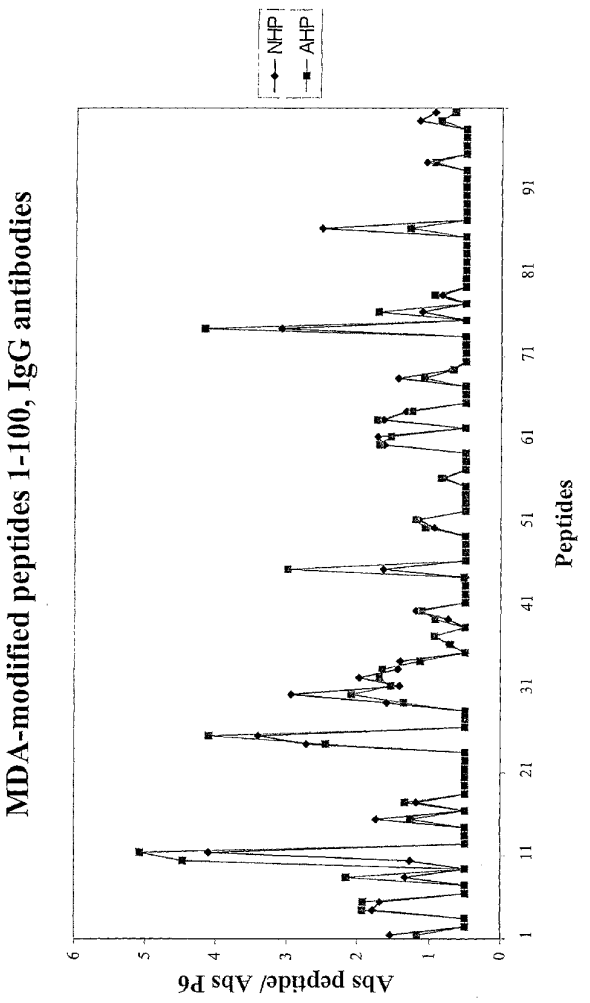

MDA-modified peptides 1-100, IgG antibodies
NHP
AHP
Abs peptide/ Abs P6
0
1
2
3
4
5
6
1
11
21
31
41
51
61
71
81
91
Peptides

FIG. 1

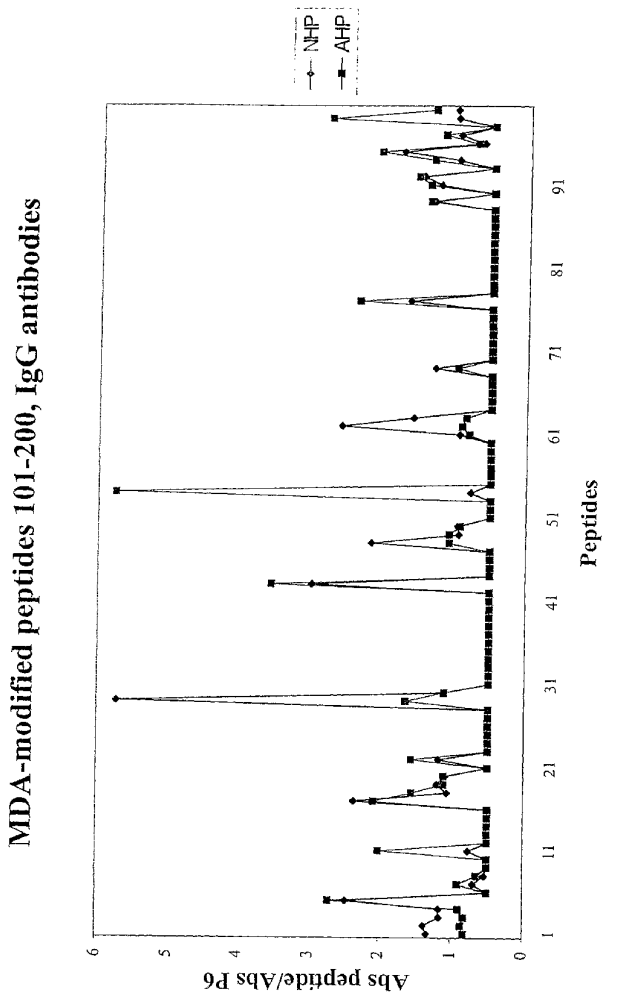

MDA-modified peptides 101-200, IgG antibodies
NHP
AHP
Abs peptide/Abs P6
0
1
2
3
4
5
6
1
11
21
31
41
51
61
71
81
91
Peptides

FIG. 2

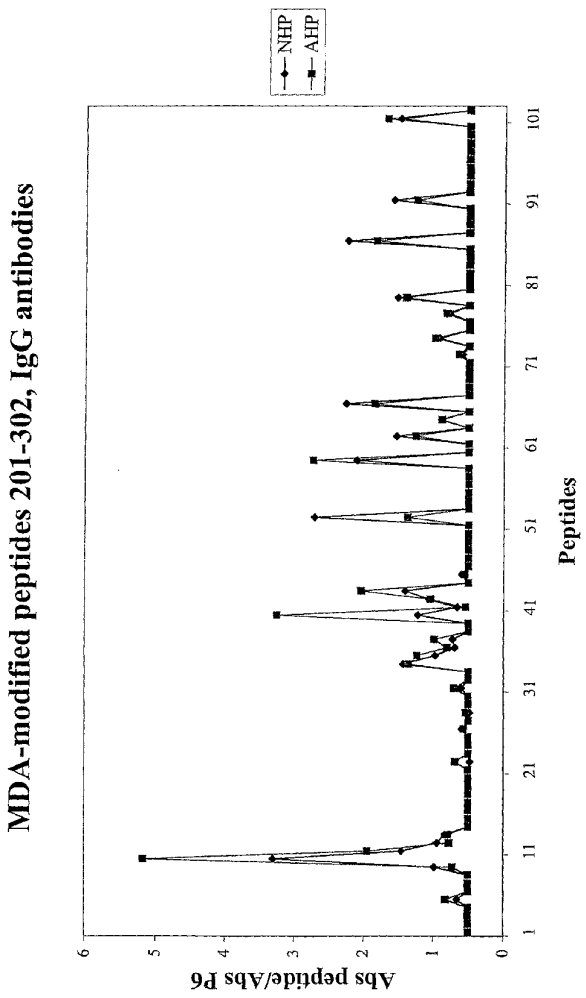

MDA-modified peptides 201-302, IgG antibodies
NHP
AHP
Abs peptide/Abs P6
0
1
2
3
4
5
6
1
11
21
31
41
51
61
71
81
91
101
Peptides

FIG. 3

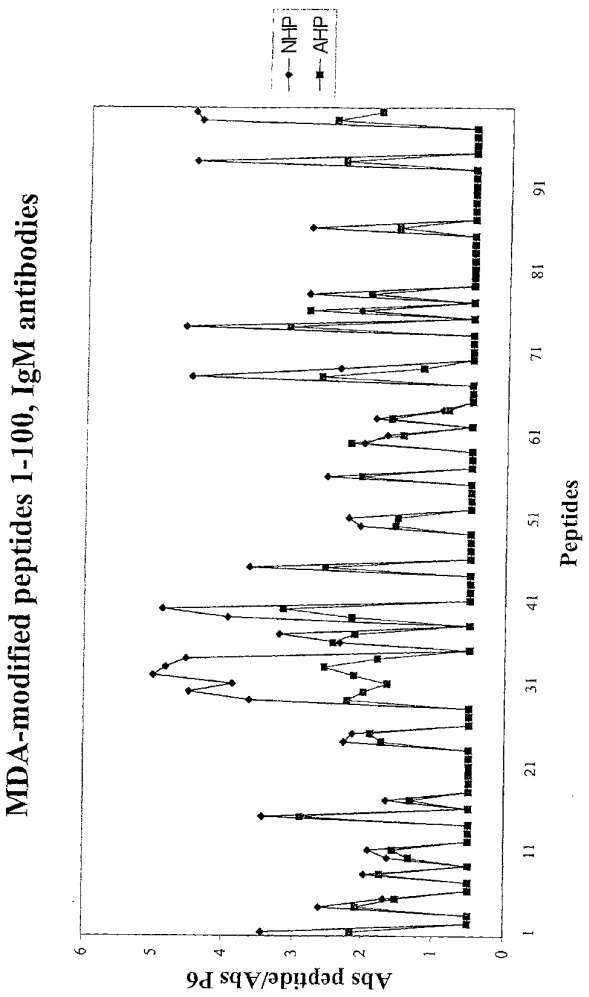

MDA-modified peptides 1-100, IgM antibodies
NHP
AHP
Abs peptide/Abs P6
Peptides
0
1
2
3
4
5
6
1
11
21
31
41
51
61
71
81
91

FIG. 4

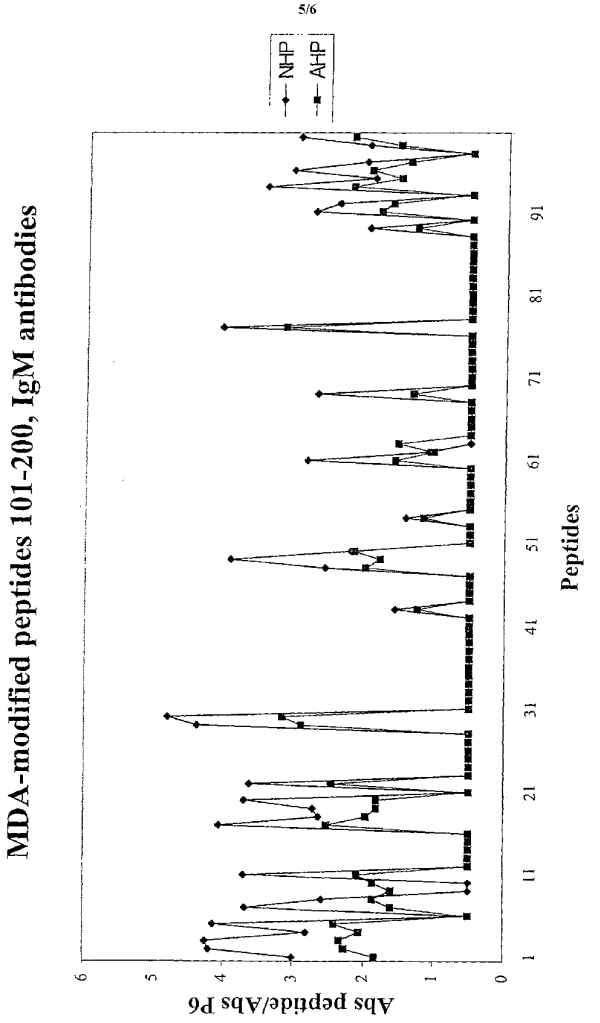

MDA-modified peptides 101-200, IgM antibodies
NHP
AHP
Abs peptide/Abs P6
Peptides
0
1
2
3
4
5
6
1
11
21
31
41
51
61
71
81
91

FIG. 5

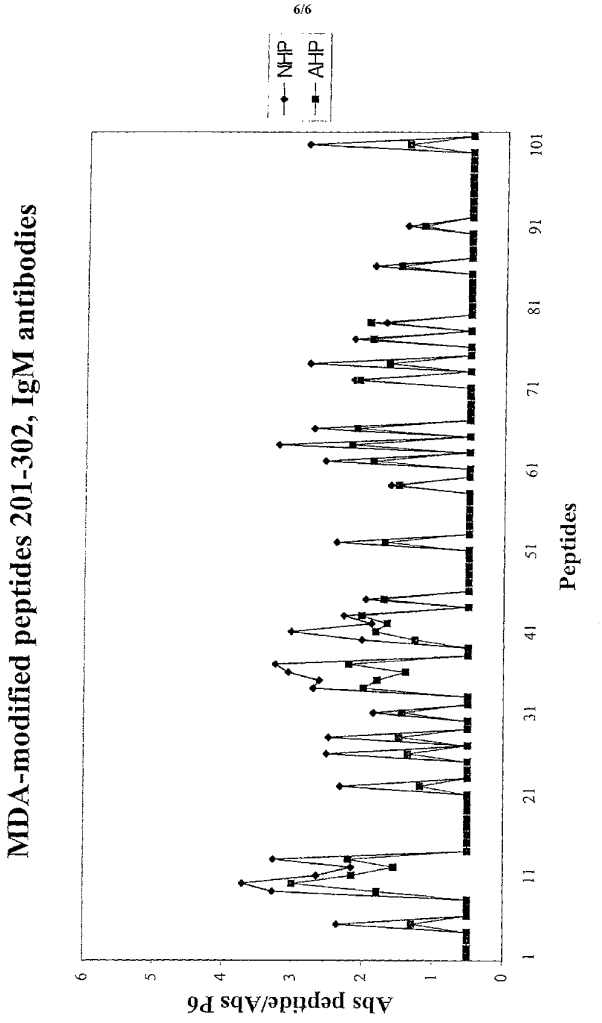

MDA-modified peptides 201-302, IgM antibodies
NHP
AHP
Abs peptide/Abs P6
Peptides
0
1
2
3
4
5
6
1
11
21
31
41
51
61
71
81
91
101

FIG. 6

Sequence listing: Seq. ID NO 1
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

FLDTVYGNCSTHFTVKTRKG

Sequence listing: Seq. ID NO 2
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

PQCSTHILQWLKRVHANPLL

Sequence listing: Seq. ID NO 3
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

VISIPRLQAEARSEILAHWS

Sequence listing: Seq. ID NO 4
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acid s peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

KLVKEALKESQLPTVMDFRK

Sequence listing: Seq. ID NO 5
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

LKFVTQAEGAKQTEATMTFK

Sequence listing: Seq. ID NO 6
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

DGSLRHKFLDSNIKFSHVEK

Sequence listing: Seq. ID NO 7
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

KGTYGLSCQRDPNTGRLNGE

Sequence listing: Seq. ID NO 8
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ

Sequence listing: Seq. ID NO 9
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

SLTSTSDLQSGIIKNTASLK

Sequence listing: Seq. ID NO 10
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

TASLKYENYELTLKSDTNGK

Sequence listing: Seq. ID NO 11
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

DMTFSKQNALLRSEYQADYE

Sequence listing: Seq. ID NO 12
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

MKVKIIRTIDQMQNSELQWP

Sequence listing: Seq. ID NO 13
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

IALDDAKINFNEKLSQLQTY

Sequence listing: Seq. ID NO 14
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

KTTKQSFDLSVKAQYKKNKH

Sequence listing: Seq. ID NO 15
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

EEEMLENVSLVCPKDATRFK

Sequence listing: Seq. ID NO 16
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

GSTSHHLVSRKSISAALEHK

Sequence listing: Seq. ID NO 17
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

IENIDFNKSGSSTASWIQNV

Sequence listing: Seq. ID NO 18
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

IREVTQRLNGEIQALELPQK

Sequence listing: Seq. ID NO 19
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

EVDVLTKYSQPEDSLIPFFE

Sequence listing: Seq. ID NO 20
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

HTFLIYITELLKKLQSTTVM

Sequence listing: Seq. ID NO 21
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

LLDIANYLMEQIQDDCTGDE

Sequence listing: Seq. ID NO 22
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

CTGDEDYTYKIKRVIGNMGQ

Sequence listing: Seq. ID NO 23
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

GNMGQTMEQLTPELKSSILK

Sequence listing: Seq. ID NO 24
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

SSILKCVQSTKPSLMIQKAA

Sequence listing: Seq. ID NO 25
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

IQKAAIQALRKMEPKDKDQE

Sequence listing: Seq. ID NO 26
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ

Sequence listing: Seq. ID NO 27
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

SLNSHGLELNADILGTDKIN

Sequence listing: Seq. ID NO 28
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

WIQNVDTKYQIRIQIQEKLQ

Sequence listing: Seq. ID NO 29
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

TYISDWWTLAAKNLTDFAEQ

Sequence listing: Seq. ID NO 30
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

EATLQRIYSLWEHSTKNHLQ

Sequence listing: Seq. ID NO 31
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

ALLVPPETEEAKQVLFLDTV

Sequence listing: Seq. ID NO 32
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

IEIGLEGKGFEPTLEALFGK

Sequence listing: Seq. ID NO 33
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

SGASMKLTTNGRFREHNAKF

Sequence listing: Seq. ID NO 34
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

NLIGDFEVAEKINAFRAKVH

Sequence listing: Seq. ID NO 35
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

GHSVLTAKGMALFGEGKAEF

Sequence listing: Seq. ID NO 36
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

FKSSVITLNTNAELFNQSDI

Sequence listing: Seq. ID NO 37
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

FPDLGQEVALNANTKNQKIR

Sequence listing: Seq. ID NO 38
Source: Apolipoprotein B fragment
Length: 20
Type: amino acids peptide
Strand: Singel
Topology: Linear

ATRFKHLRKYTYNYQAQS

【手続補正書】
【提出日】平成15年5月12日(2003.5.12)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトを含む哺乳類の免疫感作または治療のためのアポリポタンパク質Ｂ断片であって、虚血性心疾患に対する免疫源としてのまたは治療的な性質を有し、虚血性心疾患の進展の危険の増加または減少に関する抗体の存在または不存在を分析するアポリポタンパク質Ｂ断片であり、下記の群からなる天然型またはアルデヒド誘導体である、断片であるペプチド。

F L D T V Y G N C S T H F T V K T R K G
P Q C S T H I L Q W L K R V H A N P L L
V I S I P R L Q A E A R S E I L A H W S
K L V K E A L K E S Q L P T V M D F R K
D G S L R H K F L D S N I K F S H V E K
K G T Y G L S C Q R D P N T G R L N G E
R L N G E S N L R F N S S Y L Q G T N Q
S L T S T S D L Q S G I I K N T A S L K
T A S L K Y E N Y E L T L K S D T N G K
D M T F S K Q N A L L R S E Y Q A D Y E
M K V K I I R T I D Q M Q N S E L Q W P
I A L D D A K I N F N E K L S Q L Q T Y
K T T K Q S F D L S V K A Q Y K K N K H
E E E M L E N V S L V C P K D A T R F K
G S T S H H L V S R K S I S A A L E H K
I E N I D F N K S G S S T A S W I Q N V
I R E V T Q R L N G E I Q A L E L P Q K
E V D V L T K Y S Q P E D S L I P F F E
H T F L I Y I T E L L K K L Q S T T V M
L L D I A N Y L M E Q I Q D D C T G D E
C T G D E D Y T Y K I K R V I G N M G Q
G N M G Q T M E Q L T P E L K S S I L K
S S I L K C V Q S T K P S L M I Q K A A
I Q K A A I Q A L R K M E P K D K D Q E
R L N G E S N L R F N S S Y L Q G T N Q
S L N S H G L E L N A D I L G T D K I N
W I Q N V D T K Y Q I R I Q I Q E K L Q
T Y I S D W W T L A A K N L T D F A E Q
E A T L Q R I Y S L W E H S T K N H L Q
A L L V P P E T E E A K Q V L F L D T V
I E I G L E G K G F E P T L E A L F G K
S G A S M K L T T N G R F R E H N A K F
N L I G D F E V A E K I N A F R A K V H
G H S V L T A K G M A L F G E G K A E F
F K S S V I T L N T N A E L F N Q S D I
F P D L G Q E V A L N A N T K N Q K I R

ＡＴＲＦＫＨＬＲＫＹＴＹＮＹＱＡＱＳＳＳ
またはこれらのペプチドの一またはそれ以上の活性部位。
【請求項２】
下記の群から選択される請求項１記載のペプチド。
ＨＴＦＬＩＹＩＴＥＬＬＫＫＬＱＳＴＴＶＭ
ＡＬＬＶＰＰＥＴＥＥＡＫＱＶＬＦＬＤＴＶ
ＦＬＤＴＶＹＧＮＣＳＴＨＦＴＶＫＴＲＫ
ＰＱＣＳＴＨＩＬＱＷＬＫＲＶＨＡＮＰＬＬ
ＬＬＤＩＡＮＹＬＭＥＱＩＱＤＤＣＴＧＤＥ
ＣＴＧＤＥＤＹＴＹＫＩＫＲＶＩＧＮＭＧＱ
ＧＮＭＧＱＴＭＥＱＬＴＰＥＬＫＳＳＩＬＫ
ＳＳＩＬＫＣＶＱＳＴＫＰＳＬＭＩＱＫＡＡ
ＩＱＫＡＡＩＱＡＬＲＫＭＥＰＫＤＫＤＱＥ
ＩＥＩＧＬＥＧＫＧＦＥＰＴＬＥＡＬＦＧＫ
ＶＩＳＩＰＲＬＱＡＥＡＲＳＥＩＬＡＨＷＳ
ＫＧＴＹＧＬＳＣＱＲＤＰＮＴＧＲＬＮＧＥ
ＲＬＮＧＥＳＮＬＲＦＮＳＳＹＬＱＧＴＮＱ
ＳＬＴＳＴＳＤＬＱＳＧｌＩＫＮＴＡＳＬＫ
ＴＡＳＬＫＹＥＮＹＥＬＴＬＫＳＤＴＮＧＫ
ＤＭＴＦＳＫＱＮＡＬＬＲＳＥＹＱＡＤＹＥ
ＧＳＴＳＨＨＬＶＳＲＫＳＩＳＡＡＬＥＨＫ
ＩＡＬＤＤＡＫＩＮＦＮＥＫＬＳＱＬＱＴＹ
ＩＥＮＩＤＦＮＫＳＧＳＳＴＡＳＷＩＱＮＶ
ＮＬＧＤＦＥＶＡＥＫＩＮＡＦＲＡＫＶＨ
ＩＲＥＶＴＱＲＬＮＧＥＩＱＡＬＥＬＰＱＫ
ＧＨＳＶＬＴＡＫＧＭＡＬＦＧＥＧＫＡＥＦ
ＫＴＴＫＱＳＦＤＬＳＶＫＡＱＹＫＫＮＫＨ
ＦＰＤＬＧＱＥＶＡＬＮＡＮＴＫＮＱＫＩＲ
ＡＴＲＦＫＨＬＲＫＹＴＹＮＹＱＡＱＳＳＳ
またはこれらのペプチドの１種類またはそれ以上の活性部位。
【請求項３】
該断片がアルデヒドのハプテンである請求項１または２記載の断片。
【請求項４】
該断片がマロンデアルデヒドまたはヒドロキシノネナルを用いて変性されている請求項３記載の断片。
【請求項５】
天然型である請求項１または２記載のペプチド。
【請求項６】
酸化型である請求項１または２記載のペプチド。
【請求項７】
前記ペプチドが銅を用いて酸化されている請求項６記載のペプチド。
【請求項８】
前記ペプチドがリン脂質リポソームとの組み合わせで存在する請求項１または２記載のペプチド。
【請求項９】
マロンデアルデヒド（ＭＤＡ）誘導体型である請求項１または２記載のペプチド。
【請求項１０】
ヒドロキシノネナル誘導体型である請求項１または２記載のペプチド。
【請求項１１】
所望によりアジュバントを組み合わせた、虚血性心疾患の治療のための免疫療法または治

療法を目的とする医薬組成物の調製における、天然型またはＭＤＡもしくはヒドロキシノネナル誘導体型の請求項１～１０のいずれか１項に記載の１種類またはそれ以上の断片／ペプチドの使用。
【請求項１２】
免疫投与量が前記断片／ペプチド１～１００ｍｇである請求項１１記載の使用。
【請求項１３】
請求項１～１０のいずれか１項に記載の断片／ペプチドの１種類またはそれ以上の治療有効量を、所望により１種類またはそれ以上の薬理学的に無害の充填剤及び／または助剤との組み合わせで含有する医薬組成物。
【請求項１４】
前記断片／ペプチドがカチオン化ウシ血清アルブミンに結合して存在し、助剤として水酸化アルミニウムが使用される請求項１３記載の医薬組成物。
【請求項１５】
前記組成物が注射用組成物として存在する請求項１４記載の医薬組成物。
【請求項１６】
請求項１～１０のいずれか１項に記載の断片／ペプチドの１種類またはそれ以上を含む、虚血性心疾患に対するヒトを含むほ乳類の免疫感作のためのワクチン。
【請求項１７】
請求項１～１０のいずれか１項に記載の１種類またはそれ以上の前記天然型及び／またはＭＤＡ変性配列に対する精製されたまたは遺伝子組換えで生産された抗体の治療有効量を含む虚血性心疾患に対するヒトを含むほ乳類の免疫感作のためのワクチン。
【請求項１８】
前記免疫感作のための断片／ペプチドがカチオン化ウシ血清アルブミンに結合して存在し、助剤として水酸化アルミニウムが使用される請求項１６記載のワクチン。
【請求項１９】
天然型またはＭＤＡもしくはヒドロキシノネナル誘導体型の請求項１～１０のいずれか１項に記載の１種類またはそれ以上の断片および／またはペプチドの治療有効量をアテローム性動脈硬化症に罹患した、または虚血性心疾患が進展する危険性に面したヒトを含むほ乳類に投与する、アテローム性動脈硬化症に罹患した、または虚血性心疾患が進展する危険性に面したヒトを含むほ乳類の予防的治療または治療方法。
【請求項２０】
天然型またはＭＤＡ変性配列に対する精製されたまたは遺伝子組換えで生産された抗体の治療有効量を投与して受動免疫を起こす、アテローム性動脈硬化症に罹患した、または虚血性心疾患が進展する危険性に面したヒトを含むほ乳類の予防的治療または治療方法。
【請求項２１】
病態が、高齢者における、酸化ＬＤＬが炎症、細胞毒性及びプラーク破壊の危険性に寄与していると考えられる不安定なアテロームプラーク、並びに冠動脈心疾患の１またはそれ以上である請求項１９記載の方法。
【請求項２２】
アッセーにおいて一またはそれ以上の請求項１～１０のいずれか１項に記載の断片及び／またはペプチドを用いる、虚血性心疾患の進展の危険の増加または減少に関連する抗体の存在または不存在を診断する方法。
【請求項２３】
前記アッセーがイムノアッセーである請求項２２記載の方法。
【請求項２４】
前記イムノアッセーがＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、ウェスタンブロッティング、サザンブロッティングである請求項２３記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE 02/00679

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: A61K 38/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7: A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI DATA, EPO-INTERNAL, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5972890 A (ROBERT S. LEES ET AL), 26 October 1999 (26.10.99), claims 1-21, column 5, lines 22-23; column 9, lines 45-47; column 10, lines 7-11; column 18, lines 48-49; base (GSP)	1,4-6,12-25
X	& Geneseq Database(GSP),Acc.no AAY55851, 2000-02-01,100% ident. with SEQ ID No.5 of claim 4 (11 aa overlap)	1,4-6,12-25
Y	--	1-11
Y	Atherosclerosis, Vol. 138, 1998, Jacob George et al: "Hyperimmunization of apo-E-deficient mice with homologous malondialdehyde low-density lipoprotein suppresses early atherogenesis", page 147 - page 152	2-3
	--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 August 2002	05 -08- 2002
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer IDA CHRISTENSEN/BS Telephone No. +46 8 782 25 00

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE 02/00679

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 92, january 1995, Wulf Palinski et al: "Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis", page 821 - page 825 --	2-3
Y	WO 9908109 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 18 February 1999 (18.02.99), page 2, line 9 - line 20; page 35, line 11 - line 17 --	7-11
Y	US 4970144 A (GEORGE FAREED ET AL), 13 November 1990 (13.11.90), figure 4, claims --	1,4-6,23-25
A	US 5861276 A (JU-WON KWAK ET AL), 19 January 1999 (19.01.99) --	1-25
A	Geneseq databases, accession number AAW96834, publ. date 1999-04-22, Guevara JG: "Nucleic acid binding domain from apoB-100, residues 159-196" 100% identity with SEQ ID No 1 of claim 4 (in 12 aa overlap, & WO9856938,A1,1998-12-17 --	1-11
A	Geneseq databases, accession number AAW96836, publ. date 1999-04-22, Guevara JG: "Nucleic acid binding domain from apoB-100, residues 1082-1119", 100% identity with SEQ ID No 3 of claim 4 (in 20 aa overlap, & WO9856938,A1,1998-12-17 -- ---------	1-11

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte tional application No.
PCT/SE02/00679

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see next sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-25 regarding peptide sequences Nos. 1-5 of claim 4

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE02/00679

As stated by PCT Article 34 (3) (a-c) and Rule 13.2, an international application shall relate to one invention only or to a group of inventions linked by one or more of the same or corresponding "special technical features", i.e. features that define a contribution which each of the inventions makes over the prior art.

The present application relates to peptide fragments of apolipoprotein B (apo-B) and their use for diagnosis and/or treatment of ischaemic cardiovascular diseases. Claim 4 includes 38 different peptide fragments, which are linked together by a technical feature in that these peptide sequences are derived from apo-B and have the same use.

The state of the art describes the identification of peptide fragments of apo-B which are immunogenic and may be used for the production of antibodies (see e.g. US 4970144). Further, the suppression of atherosclerosis by immunisation with peptide fragments of apo-B is shown (see e.g. George J et al, 1998).

For this reason, there is no common feature in said group of peptide fragments or in their applications in diagnosis or treatment of cardiovascular diseases, which can be considered a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2. Therefore, the present application is considered to lack unity of invention. Accordingly, 38 inventions were found, one for each peptide fragment disclosed in claim 4.

The first 5 peptide sequences mentioned in claim 4 have been searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE 02/00679

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5972890 A	26/10/99	US 5726153 A	10/03/98
		US 5955055 A	21/09/99
		AU 663291 B	05/10/95
		AU 7992891 A	27/11/91
		CA 2080493 A	04/11/91
		EP 0600869 A	15/06/94
		WO 9116919 A	14/11/91
		AU 628357 B	17/09/92
		AU 3842789 A	29/11/89
		EP 0413766 A	27/02/91
		JP 3505094 T	07/11/91
		WO 8910760 A	16/11/89
WO 9908109 A2	18/02/99	AU 9103398 A	01/03/99
		US 6225070 B	01/05/01
US 4970144 A	13/11/90	EP 0209543 A	28/01/87
		WO 8604144 A	17/07/86
US 5861276 A	19/01/99	JP 9154587 A	17/06/97
		KR 185334 B	01/04/99
		US 6096516 A	01/08/00

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	39/395	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ａ６１Ｐ	9/10	Ａ６１Ｐ	9/10		
Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｎ	
		Ａ６１Ｋ	37/02		

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 シャー，プレディマン，ケイ．
アメリカ合衆国、シィエイ ９００４９、ロス アンジェルス、ノース レイトン ドライブ １１１

Ｆターム(参考) 4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA22 BA23 BA41 CA18 CA59 MA66 NA14 ZA362
4C085 AA03 AA13 AA14 AA19 AA38 BB11 BB24 CC22 CC23 FF02 GG01
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 CA42 EA20 EA24 EA50 FA10 FA20 FA30 FA40 FA44

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004529143A5	公开(公告)日	2009-07-23
申请号	JP2002578993	申请日	2002-04-05
[标]申请(专利权)人(译)	假汽车专利Iesuê日阿为主 雪松-西奈医学中心		
申请(专利权)人(译)	假汽车专利ËEsuide安倍晋三 雪松 - 西奈医疗中心		
[标]发明人	ニルソンジャン シャープレディマンケイ		
发明人	ニルソン,ジャン シャー,プレディマン,ケイ.		
IPC分类号	C07K14/775 A61K39/00 A61K39/385 A61K39/39 A61K39/395 A61P9/10 G01N33/53 A61K38/00		
CPC分类号	C07K16/18 A61K38/1709 A61K39/00 C07K14/775		
FI分类号	C07K14/775.ZNA A61K39/00.H A61K39/385 A61K39/39 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P9/10 G01N33/53.N A61K37/02		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA41 4C084/CA18 4C084/CA59 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/AA38 4C085/BB11 4C085/BB24 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/FF02 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/CA42 4H045/EA20 4H045/EA24 4H045/EA50 4H045/FA10 4H045/FA20 4H045/FA30 4H045/FA40 4H045/FA44		
代理人(译)	小仓正明		
优先权	0101232 2001-04-05 SE 0103754 2001-11-09 SE		
其他公开文献	JP2004529143A		

摘要(译)

本发明涉及针对载脂蛋白B片段产生的抗体，特别是其定义的肽，用于使用一种或多种所述抗体对哺乳动物（包括人）免疫或治疗缺血性心血管疾病。