

(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2005-502711

(P2005-502711A)

(43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/775	C O 7 K 14/775 Z N A	2 G O 4 5
A61K 39/395	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 4
A61P 3/06	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 5
C07K 16/18	A 6 1 P 3/06	4 H O 4 5
G01N 33/53	C O 7 K 16/18	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 65 頁) 最終頁に続く	

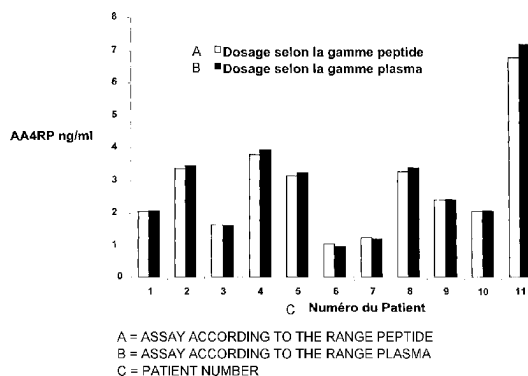
(21) 出願番号	特願2003-527428 (P2003-527428)	(71) 出願人	503067111 ジェンフィ GENFIT フランス国、エフー59120 ルー、リ ュ・ユーゲン・アヴィネ 885、リル・ メトロポール、パルク・ユーラサンテ
(86) (22) 出願日	平成14年9月6日(2002.9.6)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月8日(2004.3.8)	(74) 代理人	100075225 弁理士 篠田 文雄
(86) 国際出願番号	PCT/FR2002/003041	(72) 発明者	ナジブ, ジャミラ フランス国、エフー59211 サント、 リュ・クレマンソー 185
(87) 国際公開番号	W02003/023408		
(87) 国際公開日	平成15年3月20日(2003.3.20)		
(31) 優先権主張番号	01/11598		
(32) 優先日	平成13年9月7日(2001.9.7)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		
(31) 優先権主張番号	02/10205		
(32) 優先日	平成14年8月12日(2002.8.12)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 AA4RPアッセイのための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、試料中のアポリポタンパク質A I V関連タンパク質のアッセイまたは検出のための組成物および方法に関する。特に、本発明は、生物学的試料中のAA4RPを直接測定する方法に関する。本発明はまた、AA4RPの合成産物、対応する抗体およびそれらを含むキット、ならびに試料中のAA4RPの検出、定量、または試料中のアテローム生成および非アテローム生成リポ粒子の検出、定量のためのその使用に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列の配列番号 2 またはその免疫原性断片もしくは誘導体を含む、実質的に純粋な合成ペプチド。

【請求項 2】

可溶性であるか、または、K L H、血清アルブミンもしくはビーズのような担体分子と複合体を形成している、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のペプチドの特異的な抗体または実質的に同じ抗原特異性を有する該抗体の断片もしくは誘導体。

10

【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載のペプチドで非ヒト動物を免疫化し、抗体または抗体産生細胞を回収することより産生される、請求項 3 記載の抗体。

【請求項 5】

ポリクローナル抗体である、請求項 3 または 4 記載の抗体。

【請求項 6】

モノクローナル抗体である、請求項 3 または 4 記載の抗体。

【請求項 7】

請求項 1 または 2 記載のペプチドを非ヒト動物に投与し、抗体または抗体産生細胞を回収することを含む、特異的抗 A A 4 R P 抗体を産生するための方法。

20

【請求項 8】

試料を、請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項記載の抗体と、または、請求項 7 記載の方法により産生された抗体と接触させ、抗原 - 抗体免疫複合体の存在を検出することを含む、生物学的試料中の A A 4 R P を検出するための方法。

【請求項 9】

抗原 - 抗体免疫複合体の存在を、E I A、R I A、比濁分析、濁度法、定量イムノプロット、熱量測定、干渉分光計、表面共鳴、または力場測定により決定する、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

抗原 - 抗体免疫複合体の存在を E L I S A 試験により決定する、請求項 8 記載の方法。

30

【請求項 11】

試料を、請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項記載の抗体と、または請求項 7 記載の方法により産生される抗体と接触させ、A A 4 R P - 抗体免疫複合体を定量することを含む、生物学的試料中の A A 4 R P を定量するための方法。

【請求項 12】

定量を E L I S A 法により行なう、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

生物学的試料が、血液、血清、間質液、または組織もしくは細胞抽出物の試料である、請求項 8 ~ 12 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 14】

被験者由来の試料中の A A 4 R P のレベルを、インビトロまたはエクソビボで、請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項記載の抗体、または請求項 7 記載の方法により産生される抗体を用いて定量することを含む、被験者における脂質代謝疾患の発症のリスクまたは素因の存在を検出するための方法。

40

【請求項 15】

被験者由来の試料中の A A 4 R P の量を、インビトロまたはエクソビボで、請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項記載の抗体、または、請求項 7 記載の方法により産生される抗体を用いて測定することを含む、被験者における脂質代謝疾患を直すための処置をモニタリングするための方法。

【請求項 16】

50

毒素、マーカー、医薬、または他の治療剤のような異種断片にカップリングしている、請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項記載の、または請求項 7 記載の方法により産生される抗体。

【請求項 17】

請求項 3 ~ 6 および 16 のいずれか 1 項記載の、または請求項 7 に記載の方法により産生される抗体、ならびに、薬学的に許容される賦形剤またはビヒクルを含む医薬組成物。

【請求項 18】

請求項 1 または 2 記載のペプチドまたは請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項記載の、もしくは請求項 7 に記載の方法により産生される抗体を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、「アポリポタンパク質 A I V 関連タンパク質」(A A 4 R P) をアッセイまたは検出するための組成物および方法に関する。特に、A A 4 R P の直接的な検出および定量を可能とする方法に関する。本発明はまた、A A 4 R P の合成産物、対応する抗体、それらを含むキット、ならびに生物学的試料中の A A 4 R P を検出および定量するためのその使用に関する。

【0002】

血漿中トリグリセリドレベルの上昇は、今日では世界中の死亡原因の第一位である心臓血管疾患の発症における決定的な因子の 1 つである (Hokanson および Austin 1996)。研究により、アポリポタンパク質の濃度または構造の変化が脂質レベルの異常およびアテローム動脈硬化症のリスク増加に関連していることが示された (Rubin, Krauss ら、1991; Plump, Smith ら、1992; Duverger, Treppe ら、1996; Huang, Liu ら 1998; Lusis 2000; Rubin および Tall 2000)。血漿トリグリセリドバランスにアポリポタンパク質が関与している 1 つの非常に適切な例は A A 4 R P の例である。この近年に発見されたアポリポタンパク質は、マウスおよびヒトにおけるトリグリセリド代謝の調節において重要な因子であることが示された (Pennacchio, Olivier ら 2001)。ヒト A A 4 R P に対してトランスジェニックなマウスは、対照マウスに比べて、血漿トリグリセリドの 3 倍の減少を示した。逆に、A A 4 R P をコードする遺伝子を所有しないノックアウトマウスは、対照マウスより 4 倍高い血漿中トリグリセリドレベルを有していた。トランスジェニックマウスおよび A A 4 R P ノックアウトマウスで観察されたトリグリセリドレベルの変化は、アポリポタンパク質 C I I I (アポ C I I I) のレベルの変化に沿っており、このアポリポタンパク質は、リポタンパク質リパーゼ (L p L) によるトリグリセリドの加水分解を阻害するという事実のためにトリグリセリドレベルの積極的な指標であることが知られている。アポ C I I I の血漿中濃度は、脂質の豊富な食餌を与えたヒト A A 4 R P に対してトランスジェニックなマウスにおいて減少しており、一方、ノックアウトマウスにおけるアポ C I I I レベルは増加しており、これは、A A 4 R P の作用機序の 1 つが、アポ C I I I 遺伝子の発現を調節するものであるかもしれないことを示し、したがって、トリグリセリドの排除における A A 4 R P の積極的な役割を確認する。

【0003】

ヒトでは、非常に密接な関連が A A 4 R P 多型とトリグリセリドレベルとの間で実証されている。事実、A A 4 R P 多型のマイナーな対立遺伝子 S N P s 1 - 3 は、高いトリグリセリドレベルに関連している。代表的な結果は、野生型対立遺伝子に対してホモ接合性である被験者に比べて、これらの 1 つの対立遺伝子を有する個体におけるトリグリセリドレベルの 30% の増加である (Pennacchio, Olivier ら 2001)。

【0004】

マウスおよびヒトにおいて得られた結果は明らかに、トリグリセリド恒常性における A A 4 R P の役割の重要性を示し、A A 4 R P が、高トリグリセリド血症の予後または診断のマーカーとして使用し得ることを示唆する。それ故、A A 4 R P を検出および / または定量する方法の開発は特に関連性がある。

【0005】

10

20

30

40

50

種々の理由から、血漿中の A A 4 R P 濃度を測定することは極めて困難である。第一に、A A 4 R P は、アポリポタンパク質 A I V (アポ A I V) とで 27% の同一性および 48% の類似性を共有する。第二に、A A 4 R P は血漿中に非常に低い濃度で存在している。それ故、このアポリポタンパク質を定量および / または検出する特異的かつ感度の高い方法の開発が必須である。

【0006】

366 のアミノ酸を含む前記タンパク質は、以下の一次構造 (配列番号 1) を有する。

【0007】

【表 1】

MASMAAVLTWALALLSAFSATQARKGFWDYFSQTS GDKGRVEQIHQQKMAR
 EPATLKDSLEQDLNMMNKFLEKLRPLSGSEAPRLPQDPVGMRRQLQEELEEV
 KARLQPYMAEAHEL VGWNLEGLRQQPKPYTMDLMEQVALRVQELQEQLRVV
 GEDTKAQLLGGVDEAWALLQGLQSRVWHHTGRFKELFHPYAESLVSGIGRHV
 QELHRSVAPHAPASPARLSRCVQVLSRKLT LKAKALHARIQQNLDQLREELSR
 AFAGTGTEEGAGPDPQMLSEEVQRQLQAFRQDTYLQIAAFTRAIDQETEEVQ
 QQLAPPPPGHSAFAPEFQQTDSGKVL SKLQARLDDLWEDITHSLHDQGSHL
 GDP.

10

20

【0008】

前記タンパク質は、肝再生に関与する可能性があるとして以前に記載された R A P 3 タンパク質の配列に対応する (Genbank アクセス番号: A F 2 0 2 8 8 9 . 1 : Van der Vliet H.N. Groenink M.、Leegwater A.C.J. および Chamuleau R.A.F.M. 提出 (1999 年 11 月 9 日) Experimental Hepatology, Academic Medical Center, Meibergdreef 9、アムステルダム 1105 AZ、オランダ)。国際特許出願番号 W O 0 1 / 0 0 8 0 3 A 2 中の A A 4 R P タンパク質 (アポリポタンパク質 A I V 関連タンパク質) にも対応する (前記出願の配列番号 3)。

30

【0009】

本発明は、A A 4 R P に特異的な合成ペプチド (特異的な抗 A A 4 R P 抗体の産生に使用される) を産生する手法、および、このアポリポタンパク質を検出および直接的に定量する新規な免疫酵素的な方法を提供する。A A 4 R P の定量は、有利には、サンドイッチ型の E L I S A 法 (酵素結合免疫吸着アッセイ) により実施される。抗 A A 4 R P 抗体をタンパク質の捕獲のために固相支持体上にコーティングし、その後、今や酵素で標識されている同じ抗体を、最初の抗体に結合した A A 4 R P を検出する抗体として使用する。検出段階が酵素の基質の存在下で実施され、酵素とその基質との間に展開する反応の強度が A A 4 R P 濃度に正比例する。特異的抗 A A 4 R P 抗体を使用して A A 4 R P を検出、定量または精製するためには、ポリクローナル抗体、またはモノクローナル抗体、またはその混合物を使用することができる。

40

【0010】

本発明はまた、前記抗体、それらを含むキット、および、試料中、特に血清または血漿中の A A 4 R P の検出、定量または精製におけるその使用を記載する。前記抗体はまた、インビトロまたはインビボで A A 4 R P 活性を変調し、被験者における脂質代謝を調節するための新規な手法を与える。

【0011】

本発明の第一の具体的な目的は、配列番号 2 の配列を含む A A 4 R P に特異的な実質的に純粋な合成ペプチド、または前記ペプチドの免疫原性断片もしくは誘導体に関する。

【0012】

50

本発明の別の目的は、本明細書で先に定義したようなAA4RPに特異的な合成ペプチドを用いる免疫化ステップを含む抗AA4RPの作製法に関する。本発明はまた、前記方法にしたがって調製された抗体、より一般的には本明細書で先に定義したようなペプチドに結合できる抗体、ならびに、前記抗体の断片または誘導体を含む。

【0013】

本発明の別の態様は、本明細書で先に定義したような抗体（その断片または誘導体を含む）を使用して、生物学的試料（特に調製したリポ粒子または全血漿または血清試料）中のAA4RPを検出またはアッセイする方法に関する。

【0014】

本発明の別の目的は、本明細書で先に定義したような抗体（その断片または誘導体を含む）を用いて、被験者由来の試料中のAA4RPをインビトロで検出することを含む、被験者における脂質代謝疾患を発症させるリスクまたは素因の存在を検出する方法に関する。

10

【0015】

本発明のさらなる目的は、本明細書で先に定義したような抗体（その断片または誘導体を含む）を用いて、AA4RPを含む粒子をインビトロで検出することを含む、被験者におけるトリグリセリドの豊富なりポタンパク質およびHDLの細胞取り込みを検出またはモニタリングする方法に関する。

【0016】

本発明の別の目的は、本明細書で先に定義したような抗体（その断片または誘導体を含む）を用いて、AA4RPの量またはレベルを、被験者由来の試料中でインビトロで検出することを含む、被験者におけるアテローム動脈硬化症の形成、発症または進行を検出および/またはモニタリングする方法に関する。

20

【0017】

被験者は、一般に、哺乳動物、好ましくはヒトであり、さらにより好ましくは、例えば冠状動脈疾患などの異常脂血症（より好ましくは高トリグリセリド血症）に関連した心血管疾患を発症するリスクのある被験者である。

【0018】

本発明の別の目的は、本明細書で先に定義したような抗体（その断片または誘導体を含む）および薬学的に許容される賦形剤もしくはビヒクルを含む医薬組成物に関する。

【0019】

特異的ペプチド

本明細書で前記に示したように、本発明の1つの態様は、配列番号2の配列を含むAA4RPの特異的な実質的に純粋な合成ペプチドまたは前記ペプチドの免疫原性断片もしくは誘導体に関する。「実質的に純粋」とは、ペプチドが、アポAⅠVに存在するアミノ酸配列および/または通常存在するか、特にアポA1のようなリポ粒子と結合しているタンパク質の混入を実質的に欠いていることを示す。「合成」とは、ペプチドが、天然で得られた分子ではなく、特に実施例に記載したような人工的方法（例えば化学的合成、アセンブリ（assembly）など）により調製されていることを示す。この点から、本発明のAA4RPに特異的な合成ペプチドは、好ましくは本質的にグリコシル化されていない。本発明のペプチドは、一般に、200未満のアミノ酸、より好ましくは150未満のアミノ酸、さらにより好ましくは120未満のアミノ酸を含む。

30

40

【0020】

本発明はここで、AA4RPの特異的な合成ペプチドを作製し、これを使用して特異的な抗AA4RP抗体を生成し得ることを実証する。本発明はさらに、前記抗体が、天然にまたは可溶性抗原の形で得られる、またはリポ粒子に含まれるAA4RPの特異的に結合できることを実証する。本発明はまた、前記抗体が、AA4RPを含む異なるリポ粒子（VLDLおよびHDL）に結合できることを実証する。したがって、AA4RPの特異的な前記合成ペプチドおよびその対応する抗体は、AA4RPの検出および前記アポリポタンパク質の特異的定量に特に有利である新規な産物を表す。

【0021】

50

より具体的には、本発明の A A 4 R P の特異的な好ましい合成ペプチドは、本明細書で下記に示すような配列番号 2 の配列、または前記ペプチドの免疫原性断片もしくは誘導体を含む。

【 0 0 2 2 】

配列番号 2

【 0 0 2 3 】

【 表 2 】

ATQARKGFWD YFSQTSGDKG RVEQIHQQKM AREPATLKDS
LEQDLNMMNK FLEKLRPLSG SEAPRLPQDP VGMRRQLQEE
LEEVKARLQP YMAEA

10

【 0 0 2 4 】

前記 9 5 のアミノ酸のペプチド断片は、成熟なヒト A A 4 R P 配列の残基 2 0 ~ 1 1 4 に対応する。

【 0 0 2 5 】

実施例に示すように、前記ペプチド（配列番号 2 の配列を含む）は、特に有利な様式で、固相合成により、より具体的には B o c / B z l 手法（Merrifield 1963）を使用することにより、調製することができる。

20

【 0 0 2 6 】

「誘導体」とは、1つ以上のアミノ酸残基の1つ以上の変異、置換、欠失および/または付加を含み、実質的に同じ抗原特異性を有するペプチドを包含する。誘導体の典型的な例には、A A 4 R P 多型、スプライシングなどによる配列変化がある。特に好ましい誘導体は、配列番号 2 の配列、または配列番号 2 の配列に存在するアミノ酸とは異なる多くて 5 つのアミノ酸を含む修飾配列を含む。付加残基は、輸送または結合配列残基、保護基などであることができる。さらに、ペプチドは、その安定性を向上させるか、その免疫原性を向上させるか、「タグ」または他のキャリッジ（carriage）分子もしくはマーカーなどを取り込むよう、化学的、物理的および/または酵素的経路により修飾されていることができる。このような修飾の例には、グリコシル化、キャリッジ、マーカー（例えば放射性または酵素的標識など）の付加などがある。

30

【 0 0 2 7 】

「断片」とは、配列番号 2 の配列の 5 ~ 9 5 の連続残基、好ましくは 1 0 ~ 9 5 の連続残基を含む任意のペプチドをいう。「断片」とは、エピトープを含む配列番号 2 の配列の任意の部分を含む。

【 0 0 2 8 】

本発明の具体的な目的は、A A 4 R P の特異的なエピトープを含み、アポ A I V に特異的なエピトープを欠き、配列番号 2 の配列または前記配列の断片もしくは誘導体を含む、A A 4 R P の特異的な合成ペプチドに関する。

【 0 0 2 9 】

ペプチドは可溶性であっても、精製されていても、例えば K L H（キーホールリムペットヘモシアニン）または血清アルブミンなどの担体分子、またはさらに任意の他の不活性分子（例えば合成物）、例えばビーズなどと複合体を形成していてもよい。本発明の特定の実施態様によると、ペプチドは担体分子にカップリング（coupling）している。特に、抗体の作製に使用される場合に当てはまる。カップリングは、当業者に既知の従来の方法にしたがって実施することができる（Vaitukaitis、Robbinsら 1971）（Bassiri 1979）。

40

【 0 0 3 0 】

ペプチドは、例えば生物学的に活性な分子などの異種ペプチド性分子とコンジュゲート（conjugate）またはカップリングしていてもよい。異種性は、A A 4 R P 分子から派生しない任意のペプチドを示す。

50

【0031】

本発明の特定の目的は、配列番号2の配列を含む合成ペプチドを含み、他のタンパク質、特にアポリポタンパク質を欠く組成物に関する。

【0032】

ペプチドは、力価試験用のスクリーニング法の構成において、対照として、標準物質として、または試験校正に使用することができる。AA4RPの活性の変調にも使用することができる。また、抗AA4RP抗体の作製に特に有用である。

【0033】

抗体

これに関して、本発明の別の目的は、本明細書で先に定義したようなペプチドに結合できる任意の抗体に関する。抗体は、ポリクローナル抗体であってもよいし、モノクローナル抗体であってもよい。さらに、「抗体」とは一般に、任意の抗体断片または誘導体、特に、実質的に同じ抗原特異性を示す前記モノクローナルまたはポリクローナル抗体の断片または誘導体を含む。後者は、抗体断片(Fab、Fab₂、CDRなど)、ヒト化抗体、多機能抗体、単鎖抗体(ScFv)などを含む。本発明の抗体は、動物を免疫化し、血清(ポリクローナル)または脾臓細胞を回収すること(適切な細胞系との融合によるハイブリドーマの作製のため)を含む、従来の方法により作製することができる。

10

【0034】

マウス、げっ歯類、霊長類、ウマ、ブタ、ウサギ、家禽などを含む種々の種に由来するポリクローナル抗体の作製法は、例えばVaitukaitisら(Vaitukaitis、Robbinsら、1971)に見いだすことができる。抗原をアジュバント(例えばフロイントのアジュバント)と合わせ、動物に、典型的には皮下注射により投与する。繰り返し注射してもよい。血液試料を回収し、免疫グロブリンまたは血清を単離する。

20

【0035】

異なる種からモノクローナル抗体を作製する方法は、例えばHarlowら(Harlow 1988)またはKohlerら(KohlerおよびMilstein 1975)に見いだすことができる。前記方法は、動物を抗原で免疫化し、その後、脾臓細胞を回収し、これをその後、骨髄腫細胞などの不死化細胞と融合することを含む。得られたハイブリドーマはモノクローナル抗体を生じ、限界希釈により選択して個々のクローンを単離することができる。抗体はまた、例えばWardら(Ward、Gussowら 1989)に開示されているようなコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーの選択により作製することができる。

30

【0036】

好ましい本発明の抗体は、好ましくは配列番号2の配列または前記ペプチドの免疫原性断片もしくは誘導体、例えば少なくとも1つのエピトープを含む亜断片を含む、本明細書で前記したような特異的で実質的に純粋なAA4RPの合成ペプチドを用いた免疫化により調製する。

【0037】

FabまたはFab₂断片は、従来の方法によるプロテアーゼを用いた消化により作製することができる。ヒト化抗体は、例えばRiechmannら(Riechmann 1988)(Jones 1986)に記載のような方法の1つにより調製することができる。

40

【0038】

本発明はまた、配列番号2の配列を有するペプチドまたは前記ペプチドの免疫原性断片もしくは誘導体を非ヒト動物に注射し、抗体または抗体産生細胞を回収することを含む、抗AA4RP抗体の作製法に関する。この方法により、有利には特異的抗体の作製が可能となる。特異性は、他の循環中の血液タンパク質との交差反応がないことを実証することにより確認することができる。より一般的には、特異性は、抗体が任意の他の抗原に結合するよりも高い親和性でAA4RPに結合できることを示す。実施例に示すように、本発明のポリクローナル抗体は、高い効率でAA4RPを検出および/またはアッセイするために使用することができる。

【0039】

50

抗体は、共有結合的にまたはそうでなく、直接的に、またはカップリング剤を用いたいずれかで、毒素、マーカー、医薬、または任意の他の治療剤などの異種断片にカップリングすることができる。マーカーは、放射性標識、酵素、蛍光剤、磁気粒子などからなる群から選択することができる。好ましい毒素は、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素などにより例示される。医薬または治療剤は、特に、リンホカイン、抗生物質、アンチセンス配列、成長因子などから選択される。抗体を前記の異種断片とカップリングする方法は、例えば米国特許第4,277,149号および米国特許第3,996,345号に示されている。

【0040】

本発明の抗体は、治療、予防、診断用途、精製、検出などを含む多くの使い道を有する。

【0041】

インビトロでは、スクリーニング剤として、または、異なる生物学的試料（例えば血液試料）を含む種々の試料から抗原を精製するために使用することができる。また、被験者から回収した試料、典型的には哺乳動物または好ましくはヒト由来の血液試料中の、リポ粒子中のAA4RPの存在または量を検出または定量するために使用することができる。

【0042】

検出/アッセイ

これに関して、本発明の別の目的は、生物学的試料中のAA4RPを検出、測定、アッセイ、または定量する方法であって、試料を、本明細書で先に定義したような抗体（その断片または誘導体を含む）と接触させ、抗原-抗体免疫複合体（の存在）を検出、測定、アッセイ、または定量することを含む方法に関する。典型的には、前記の方法により、例えば標準条件または校正曲線との比較により、試料中のAA4RPレベルを測定することが可能となる。

【0043】

免疫複合体の測定は、直接的または競合的免疫学的方法などの従来技術により、例えばRIA法（ラジオイムノアッセイ）、EIA（エレクトロイムノアッセイ）、比濁分析、濁度法、定量イムノプロット、熱量測定、干渉分光計、表面共鳴、力場測定、開発中の他のバイオセンサーなどにより実施することができる。しかし、本発明の特に好ましい目的は、ELISAサンドイッチアッセイに基づいた方法に関する。事実、本明細書で前記に示したように、抗体は特異的であり、試料中のAA4RPを認識でき、したがって、ポリクローナル抗AA4RP抗体（またはモノクローナル抗体の混合物）を用いてのAA4RPの正確で感度が高い効率的なアッセイが可能となる。

【0044】

それ故、本発明のより好ましい目的は、試料（またはその希釈液）を、本明細書で先に定義した、捕獲抗体と呼ばれる、支持体上に固定した第一抗体（その断片または誘導体を含む）と接触させ、本明細書で先に定義した、検出抗体と呼ばれる第二標識抗体（その断片または誘導体を含む）により形成された抗原-抗体免疫複合体を露呈させることを含む、生物学的試料中のAA4RPを検出、測定、アッセイまたは定量する方法に関する。

【0045】

特に好ましい態様において、捕獲抗体および検出抗体はポリクローナル抗体である。それらは同じポリクローナル抗体であってもよい。捕獲抗体は、任意のタイプの支持体、特にプラスチック、例えばプレート、ビーズ、カラム、ゲルなどに固定化することができる。有利には、支持体はマルチウェルプレートである。固定化は、典型的には、ウェルの表面に抗体を吸着させることにより達成される。任意の他のコーティング法を、直接的または間接的に、共有結合的にまたはそうでなく使用し得ることが理解されよう。捕獲抗体は、典型的には可溶性の形態で使用する。その検出および定量が可能となるように最初に標識する。放射能、蛍光、酵素、発光標識などの種々のタイプの標識が存在する。特定の態様において、標識は酵素標識であり、免疫複合体は、酵素活性の測定により判る。酵素標識の具体例はペルオキシダーゼであり、その活性は、例えばOPD基質の存在下で可視化することができる。

【0046】

10

20

30

40

50

本発明の特に好ましい目的は、生物学的試料中のA A 4 R Pの検出、測定、アッセイ、または定量法であって、試料（またはその希釈液）を、本明細書で先に定義したようなポリクローナル捕獲抗体が固定化されている支持体と、特異的な免疫複合体の形成が可能となる条件下で接触させ、標識ポリクローナル検出抗体により最終的に形成された抗原 - 抗体複合体を露呈させることを含み、前記ポリクローナル抗体が本明細書で先に定義した通りである方法に関する。

【0047】

方法は、血漿、血清、間質液、細胞培養上澄みなどを含む異なる生物学的試料で実施することができる。試料は、被験者（例えばヒト被験者）から回収し、試験に直接使用することができる。あるいはまた、試料を希釈したり、後日の試験に備えて保存（例えば凍結）したりしてもよい。本発明はまた、非常に高い感度、再現性および反復性で、特異的抗A A 4 R P抗体の使用により、リポ粒子中のA A 4 R P濃度を測定する。

10

【0048】

検出は、異なる実験的、臨床的、疫学的、予後のおよび診断条件下で実施することができる。特に、この方法を使用して、ある被験者が脂質代謝疾患を発症させる素因を検出することができる。

【0049】

したがって、本発明の特定の目的は、被験者における脂質代謝疾患を発症させる素因またはリスクの存在を検出する方法であって、本明細書で先に定義したような抗体（その断片または誘導体を含む）を使用して、被験者から採取した試料上で、A A 4 R Pを含むリポ粒子をインビトロで検出またはインビトロで測定することを含む方法に関する。A A 4 R Pレベル（正常な被験者における平均値と比較することにより）は、脂質代謝疾患を発症させるリスクの高さを特徴とすることができる。

20

【0050】

本発明の別の目的は、被験者におけるH D Lおよびトリグリセリドの豊富なりポタンパク質の細胞取り込みを検出またはモニタリングする方法であって、本明細書で先に定義したような抗体（その断片または誘導体を含む）を使用して、リポ粒子に存在するA A 4 R Pの量をインビトロで検出することを含む方法に関する。

【0051】

本発明の別の目的は、被験者における脂質代謝疾患を直す処置をモニタリングする方法であって、該処置を該被験者に施した後、本明細書で先に定義したような抗体（その断片または誘導体を含む）を使用して、該被験者由来の試料におけるA A 4 R Pレベルをインビトロで検出することを含む方法に関する。処置の効力は、被験者におけるA A 4 R Pレベルと相関する。これらの結果は、A A 4 R Pのレベルもしくは活性を調節する処置能力または被験者における正常なA A 4 R Pレベルもしくは活性を回復する能力と相関させることができる。

30

【0052】

本発明のさらなる目的は、被験者の生理的状態、例えば被験者における脂質代謝レベルを評価する方法であって、本明細書で先に定義したような抗体（その断片または誘導体を含む）を使用して、被験者由来の試料におけるA A 4 R Pレベルをインビトロまたはエクソビボ（*ex vivo*）で検出することを含む方法に関する。

40

【0053】

本明細書で先に示したように、該方法は、異なる試料（典型的には血漿または血清）に対し、R I A、E I A、比濁分析、濁度法、定量イムノプロット、熱量測定、干渉分光計、表面共鳴、力場測定、開発中の他のバイオセンサーなどにより、または好ましくはE L I S Aサンドイッチアッセイにより実施することができる。

【0054】

本発明はまた、本明細書で先に定義したような抗体およびおそらくは薬学的に許容される賦形剤もしくはビヒクルを含む医薬組成物を含む。

【0055】

50

本発明はさらに、本明細書で前記したようなペプチドまたは抗体を含むキットに関する。キットは、任意の試料における A A 4 R P の検出または定量に使用することができる。

【 0 0 5 6 】

本発明の他の態様および利点を以下の実施例に記載するが、これは、説明のためであり、限定のために記載するものではない。

【 実施例 】

【 0 0 5 7 】

実施例 1 : ペプチド配列

1 . 適切なペプチド配列の選択

以下のペプチド断片を合成した。前記断片は、可撓性、親水性、抗原性、および二次構造を予測する種々のアルゴリズムを使用することにより規定した。95のアミノ酸を含む前記断片は、配列番号1の残基20~114に対応する。

【 0 0 5 8 】

【 表 3 】

ATQARKGFWD YFSQTSGDKG RVEQIHQQK AREPATLKDS
LEQDLNMMNK FLEKLRPLSG SEAPRLPQDP VGMRRQLQEE
LEEVKARLQP YMAEA

【 0 0 5 9 】

2 . ペプチド合成

ペプチドは、0.5 mmol (0.57 mmol/g) M B H A 樹脂上で B o c / B z l 法を使用して、A B I 4 3 1 A 自動合成機 (Applied Biosystems 社、米国カリフォルニア州) で固相合成 (Merrifield 1963) により合成した。各アミノ酸を、キャッピングすることなくジシクロヘキシルカルボジイミド / ヒドロキシベンゾトリアゾールの存在下で2回カップリングした。側鎖保護基は以下の通りであった : A r g (T s)、A s p (O c h e x)、G l u (O c h e x)、L y s (2 - C l - Z)、H i s (D n p)、S e r (B z l)、T h r (B z l)、M e t (O)、T r p (f o r m y)、および T y r (B r - Z)。

【 0 0 6 0 】

ヒスチジン残基上の D n p 基は、支持体からの開裂の前に、D C M 媒体中、10% -メルカプトエタノール、5% ジイソプロピルエチルアミンの存在下で2時間、その後 N M P 媒体中で2時間処理することにより、ペプチドから排除した。ペプチジル樹脂を、D C M 媒体中50% T F A で20分間処理し、末端アミノ酸 B o c を排除した。ペプチドを樹脂から開裂させると同時にスロー & ラピッド H F 法にしたがって脱保護した。樹脂 (1 g) を、p - クレゾール (0.75 g)、p - チオクレゾール (0.25 g) およびジメチルスルフィド (0.5 ml) の存在下、0 の無水 H F (2.5 ml) で処理した。

【 0 0 6 1 】

3時間後、フッ化水素およびジメチルスルフィドを真空蒸発により排除し、残りのスカベンジャーおよび二次生成物をジエチルエーテルで抽出した。反応容器に、p - クレゾール (0.75 g)、p - チオクレゾール (0.25 g)、および無水 H F 10 ml を再度添加し、混合物を0 で1.5時間インキュベートした。フッ化水素を蒸発により排除し、残渣をジエチルエーテルの存在下で混合した。残渣をろ過し、ジエチルエーテルで洗浄し、10% 酢酸水溶液 200 ml で抽出し、その後、凍結乾燥した。

【 0 0 6 2 】

質量分析

分子量は、イオンエレクトロスプレー質量分析計で測定した。エレクトロスプレースペクトルは、イオンスプレー (噴霧器を担持したエレクトロスプレー) を装備した単一四極子イオンエレクトロスプレー質量分析計である A P I 装置 (Perkin-Elmer-Sciex) を使用することにより得た。

【 0 0 6 3 】

10

20

30

40

50

4. 免疫化

ペプチドを完全フロイントアジュバント中で乳化し、ウサギに、最初の2回の注射では1回あたり0.5mgの用量で、その後、2週間毎に同じアジュバント中で0.25mgのブースター用量で皮下注射した。

【0064】

実施例2：ウサギ特異的抗AA4RP抗体の単離および特性決定

1. 抗AA4RP抗体の単離

ポリクローナル抗体を、27%硫酸ナトリウムで沈降することにより単離し、その後、AA4RPペプチド残基20~114AA(Axen, Porathら1967)とカップリングした、活性化セファロス4Bゲル(Pharmacia, Uppsala, スウェーデン)でのアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。抗原性ゲルに保持されなかったタンパク質を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS:リン酸50mmol/L, pH7.2, NaCl 150mmol/L)で洗浄することにより排除した。AA4RPゲルに特異的に結合しなかった画分をPBS25mmol/Lで排除した。AA4RP特異的ポリクローナルIgGを0.2MグリシンpH2.8で溶出した。精製した抗体をただちにPBS10mmol/Lに対して透析し、その後、Amiconシステム(カットオフ100kD)(Amicon, Dr. Bervely, 米国マサチューセッツ州)で限外ろ過により濃縮し、タンパク質含量(Lowry O.H. 1951)についてアッセイし、その後、1mlアリコート(1mg)で-30℃で保存した。

【0065】

2. ウェスタンブロット解析

2.1 - プロトコール:

抗体純度および特異性をウェスタンブロット(Towbin, Staehelinら, 1979)により解析した。ヒトHDL、LDLおよびVLDL粒子を変性SDS-PAGE電気泳動(5~24%)にかけ、その後、ニトロセルロース膜に転写し、精製した抗ヒトAA4RP抗体と反応させた。免疫反応性タンパク質を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合抗IgGポリクローナル抗体(Sanofi-Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, フランス)で可視化した。反応を化学ルミネセンスにより展開した(Amersham, Pharmacia, Biotec)。

【0066】

2.2 - 結果

結果を図1に提示する。抗AA4RP抗体により判明した特異的バンドが、32.5kDaの分子量マーカーと47.5kDaの分子量マーカーの間に位置することがこの図面で分かる。

【0067】

2.3 - 解釈

異なるヒトリポタンパク質に関するイムノブロット結果により、AA4RPがVLDLおよびHDL、主にHDLに局在することが示される。

【0068】

VLDL中のAA4RPの存在は、これらのトリグリセリドの豊富なりポタンパク質の代謝調節におけるこのアポリポタンパク質の役割を説明し、したがって、これらのアテローム生成性脂質の濃度の調節を説明する。

【0069】

HDLにおけるAA4RPの局在は、逆コレステロール輸送におけるこれらの粒子の役割に疑いなく関連している。事実、HDLに局在するアポリポタンパク質の大半は、HDLによる細胞由来コレステロールの取り込みを促進し、肝臓に移され、そこで排除される。

【0070】

実施例3：AA4RPのELISAアッセイ(サンドイッチ型)

1. ELISA試験に使用される試薬および材料

1.1 - 捕獲抗体

抗AA4RP母液を1mg/mlに濃縮し、コーティング(96ウェルプレートのウェル中における抗体の固定)を10µg/mlで実施し、抗体をリン酸緩衝生理食塩水(0.1MPBS, 0.15MNaCl, pH7.2~7.4)で希釈した。

10

20

30

40

50

【0071】

1.2 - 検出抗体

捕獲に使用した同じ抗体をペルオキシダーゼで標識した。これを、1% BSAを含む0.1 M PBS緩衝液中で1:5000に希釈した。

【0072】

1.3 - 標準物質

20~114ペプチドを使用して、一連の検量点を調製した。ペプチド濃度は1 mg/mlであった。検量曲線をプロットするために、標準物質を、以下の表にしたがって、0.1 M PBS / 1% BSAに希釈した。

【0073】

【表4】

点	濃度 (ng/ml)
1	125.00
2	62.50
3	31.25
4	15.62
5	7.81
6	3.90
7	1.95
8	0.97
9	0.48
10	0.24
11	0.12

10

20

30

【0074】

1.4 - 試料の調製

新鮮な試料が解析には勧められる。血漿は、確立された手順により収集し、臨床実験室で使用すべきである。必要であれば、血漿を1週間まで2ないし8で保存してもよい。凍結して保存されている試料はより長期間使用することができる。試料はその起源にしたがって希釈した：

- 脂質の正常な被験者由来の血漿：1.3 ~ 4倍
- 高トリグリセリド血症被験者由来の血漿：2 ~ 16倍
- 超遠心分離により血漿から調製したHDL：4 ~ 128倍

40

希釈はPBS / 1% BSA中であった。

【0075】

2. プロトコール

- 「コーティング」：標識されていない抗AA4RP捕獲抗体を、室温で一夜、100 µl/ウェル（96ウェルマイクロタイタープレート）でインキュベートした。
- プレートの洗浄：プレート上に結合していない抗体は、プレートを0.1 M PBSで4回洗浄することにより排除した。
- 試料の添加および検量点：ペプチド検量溶液、ヒト血漿およびHDLを、1ウェルあたり100 µl加え、その後、37で2時間インキュベートした。
- 洗浄：抗AA4RP捕獲抗体に結合しなかった過剰なペプチドおよび生物学的試料由来

50

の A A 4 R P は、マイクロタイタープレート を 4 回連続で洗浄することにより排除した。

- 検出：検出は、P B S / 1 % B S A 中 1 / 5 0 0 0 に希釈したペルオキシダーゼ標識抗 A A 4 R P 抗体を用いて実施した。1 0 0 μ l の調製液をマイクロタイタープレートの各ウェルに加えた。インキュベートは 3 7 $^{\circ}$ C で 2 時間であった。

- 洗浄：過剰な抗 A A 4 R P 検出抗体は、プレートを 0 . 1 M P B S で 4 回洗浄することにより排除した。

- 酵素比色反応の展開：1 ウェルあたり 1 0 0 μ l の o - フェニレンジアミン二塩酸塩 (O P D) 基質の添加により実施し、その後、反応を暗所で 3 0 分間展開した。

- 停止反応：1 ウェルあたり 1 0 0 μ l の 1 N H C l の添加による。

- 吸光度読み取り：4 9 2 n m に設定した分光光度計。

10

【 0 0 7 6 】

3 . 結果および解釈

3 . 1 - 検量曲線

検量曲線は、検量点の種々の希釈度の濃度に応じて、光学密度の増加を示す 4 つの未知数の関数にしたがって作成した。それは E L I S A 免疫酵素アッセイに特徴的なシグモイド曲線である (図 2) 。

【 0 0 7 7 】

種々の希釈度の 2 0 ~ 1 1 4 ペプチド、脂質の正常なヒト血漿および H D L を示す曲線がオーバーラップし、これは、抗 A A 4 R P 抗体が、合成ペプチドと、ヒト血漿またはリポタンパク質中の天然 A A 4 R P とに同じ親和性を有することを示す。さらに、ペプチドまたはプールしたヒト血漿のいずれかから作成した一連の検量点を使用する、数人の被験者における A A 4 R P のアッセイは、A A 4 R P 濃度について有意に類似した結果を与えた (図 3) 。

20

【 0 0 7 8 】

3 . 2 - 作業範囲および検出限界

1 ~ 6 2 n g / m l の約 2 L o g で、非常に異なる A A 4 R P 濃度を有する試料のアッセイを可能とする。検出限界は 1 n g / m l であり、これはアッセイが非常に高い感度を有することを示す。

【 0 0 7 9 】

3 . 3 - 正常値

トリグリセリドレベルが 1 m g / m l を超えない脂質の正常な被験者の集団における A A 4 R P アッセイにより、9 . 8 4 ~ 2 9 . 4 4 n g / m l の範囲のアポリポタンパク質濃度値が得られた。

30

【 0 0 8 0 】

実施例 4 : 異なる血漿区分における A A 4 R P 濃度と全トリグリセリドレベルとの相関

1 . プロトコール

血漿トリグリセリドレベルと、血漿中 A A 4 R P 濃度、または非 H D L リポタンパク質 (V L D L 、 I D L および L D L) 中の A A 4 R P 、または H D L リポタンパク質中の A A 4 R P との相関を、0 . 5 ~ 4 m g / m l のトリグリセリドレベルを有する集団で決定した。

【 0 0 8 1 】

1 . 1 - H D L および非 H D L リポタンパク質の調製

H D L および非 H D L リポタンパク質は、異なる被験者由来の血漿にリンタングステン酸および M g 2 + を添加することによって後者を沈降させることによって調製した (アポ B 含有リポタンパク質、すなわち V L D L 、 I D L および L D L の選択的沈降) (B u r s t e i n 、 S c h o l n i c k ら 1 9 7 0 ; L o p e s - V i r e l l a 、 S t o n e ら 1 9 7 7) 。簡潔には、血漿を、リンタングステン溶液中、室温で 1 0 分間インキュベートし、その後、2 5 0 0 r p m で 1 5 分間遠心分離し、最後に H D L を含む上澄みを、非 H D L リポタンパク質を含むペレットから分離した。

40

【 0 0 8 2 】

1 . 2 - トリグリセリドアッセイ

50

血漿中トリグリセリドを、C F A S 脂質キャリブレーター、参照番号 7 5 9 3 5 0 (Boehringer Mannheim社、ドイツ)を用いて作成した検量曲線に対して、酵素比色法によりアッセイした。検量曲線は、16 ~ 500 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲を網羅するものであった。100 μl の各試料希釈液または検量標準物質を、96 ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに被着させた。次に、200 μl のトリグリセリド試薬、参照番号 7 0 1 9 1 2 (Boehringer Mannheim社、ドイツ)を各ウェルに加え、プレートを 37 で 30 分間インキュベートした。492 nmに設定した分光光度計で光学密度(OD)を読み取った。各試料中のトリグリセリド濃度を、一次方程式 $y = ax + b$ (y はODを示し、 x はトリグリセリド濃度を示す)としてプロットした標準曲線から計算した。

【0083】

10

1. 3 - HDLリポタンパク質および非HDLリポタンパク質中の全AA4RPのアッセイ

血漿中およびHDLリポタンパク質中の全AA4RPレベルを、実施例3のプロトコールにしたがってアッセイした。非HDLリポタンパク質中のAA4RP濃度を、全血漿AA4RP濃度と、HDLリポタンパク質の濃度との差異として計算した。

【0084】

2. 結果および解釈：

血漿中のAA4RP濃度と、全トリグリセリドまたは非HDLリポタンパク質のトリグリセリドの濃度との間に相関関係は認められなかった。一方、タンパク質の濃度と、HDLリポタンパク質中のトリグリセリド濃度との間には有意な負の相関が見いだされた($r = 0.5$ 、 $p < 0.001$)。この知見は、トリグリセリドレベルの増加が大きくなればなるほど、HDL中のAA4RP濃度の低下は大きくなり、よって、HDL、ひいてはこのタイプのリポタンパク質中に存在するAA4RPの抗アテローム生成的役割が確認される。

20

【0085】

実施例5：ヒトAA4RPにトランスジェニックなマウスにおけるAA4RPの定量

1. - プロトコール：

AA4RP濃度を、正常なC57BL/6マウス、非トランスジェニックFVBマウス、FVB遺伝的背景をもつAA4RPノックアウトマウス(KO)およびヒトAA4RPにトランスジェニックなマウス(FVB遺伝的背景)で測定した。アッセイプロトコールは、実施例3に記載のものと同一であった。

30

【0086】

2. 結果および解釈：

図4は、アッセイにより、ヒトAA4RPにトランスジェニックなマウスにおいてのみAA4RPが検出されたことを示し、ヒトとマウスとの間でのこの方法の特異性を実証する。これは非常に興味深い。なぜなら、内因性タンパク質が混入することなく修飾動物モデルにおける外来性AA4RPを定量することが可能であり、したがって、動物の内因性AA4RPの作用と外来性起源の作用とを区別できるからである。

【0087】

【表5】

参考文献

- Axen, R., J. Porath et al. (1967). "Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides." Nature **214**(95): 1302-4.
- Bassiri, R. M., Dvorak J. and Utiger R.D. (1979). Thyrotropin-releasing hormone. Methods of hormone radioimmunoassay. B. M. In: Jaffe and Behrman H.R. (Eds). New York, New York Academic Press: p: 46. 10
- Burstein, M., H. R. Scholnick et al. (1970). "Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions." J. Lipid Res. **11**(6): 583-95.
- Duverger, N., G. Tremp et al. (1996). "Protection against atherogenesis in mice mediated by human apolipoprotein A-IV." Science **273**(5277): 966-8.
- Harlow, E. a. L. D., Ed. (1988). Antibodies: a Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Publications. 20
- Hokanson, J. E. and M. A. Austin (1996). "Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies." J. Cardiovasc. Risk **3**(2): 213-9.
- Huang, Y., X. Q. Liu et al. (1998). "Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia." J. Biol. Chem. **273**(41): 26388-93. 30
- Jones, P. T., Dear P. H., Foote J., Neuberger M. S. and Winter G. (1986). "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse." Nature **321**: 522-525.
- Kohler; G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495-7.
- Lopes-Virella, M. F.P. Stone et al. (1977). "Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods." Clin. Chem. **23**(5): 882-4. 40
- Lowry O.H., R. J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951). "Protein measurement with folin phenol reagent." J. Biol. Chem. **193**: 265-275.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-41.

- Merrifield, R. B. (1963). "Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide." J. Am. Chem. Soc **85**: 2149-2154.
- Pennacchio, L. A., M. Olivier et al. (2001). "An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing." Science **294**(5540): 169-73.
- Plump, A. S., J. D. Smith et al. (1992). "Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells." Cell **71**(2): 343-53. 10
- Riechmann, L., Clark M., Waldmann H. and Winter G. (1988). "Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma." Nature **332**: 323-327.
- Rubin, E. M., R. M. Krauss et al. (1991). "Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI." Nature **353**(6341): 265-7.
- Rubin, E. M. and A. Tall (2000). "Perspectives for vascular genomics." Nature **407**(6801): 265-9. 20
- Towbin, H., T. Staehelin et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**(9): 4350-4.
- Vaitukaitis, J., J. B. Robbins et al. (1971). "A method for producing specific antisera with small doses of immunogen." J. Clin. Endocrinol. Metab. **33**(6): 988-91. 30
- Ward, E. S., D. Gussow et al. (1989). "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli." Nature **341**(6242): 544-6.

【図面の簡単な説明】

【 0 0 8 8 】

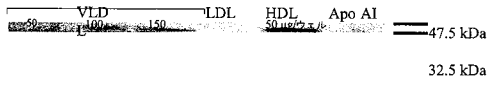
【図 1】抗体特異性。抗 AA4RP 抗体特異性の SDS PAGE 対照ならびに VLDL および HDL における AA4RP 分布の実証。 40

【図 2】AA4RP に対する ELISA 試験。検量曲線を、実施例 3 に記載のプロトコールにしたがって、ペプチド 20 ~ 114 の濃度 ()、脂質の正常な被験者由来の血漿の濃度 ()、および脂質の正常な被験者由来の血漿から調製した HDL の濃度 () に対する OD としてプロットした。

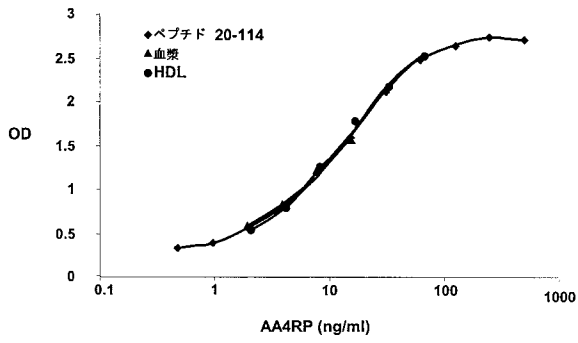
【図 3】ELISA による、ペプチド 20 ~ 114 の検量系から計算した血漿または脂質の正常な被験者からプールした血漿中の AA4RP 濃度。

【図 4】非トランスジェニック C57 BL/6 マウスおよび FVB マウス、FVB 遺伝子的背景を有する AA4RP ノックアウト (KO) マウスおよびヒト AA4RP (FVB 遺伝的背景) にトランスジェニックなマウスにおける AA4RP の ELISA アッセイ。

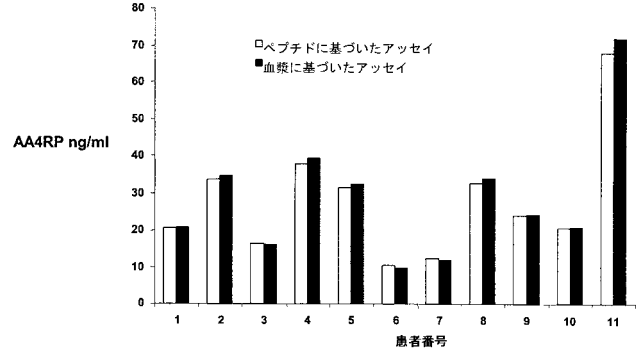
【 図 1 】



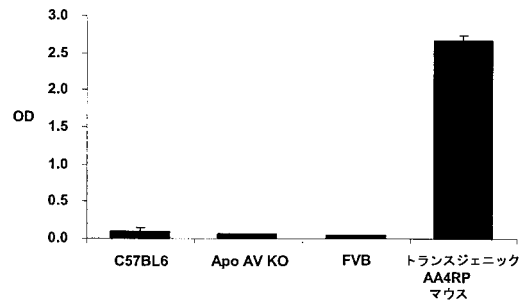
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【国際公開パンフレット】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
20 mars 2003 (20.03.2003)

PCT

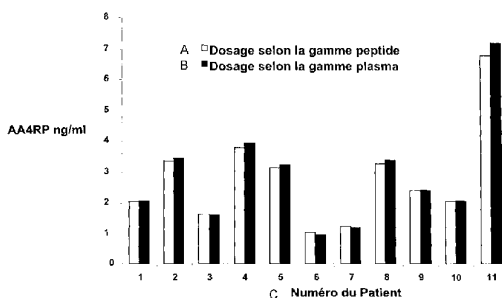
(10) Numéro de publication internationale
WO 03/023408 A1

- (51) Classification internationale des brevets : G01N 33/92, C07K 14/47
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : GENFIT [FR/FR]; Parc Eurasanté, Lille Métropole, 885, rue Eugène Avinée, F-59120 Loos (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR02/03041
- (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : NAJIB, Jamila [FR/FR]; 185, rue Clémenceau, F-59211 Santes (FR); MAJID, Zouher [MA/FR]; 89, rue des Chrysanthèmes, F-59700 Marcq en Baroeul (FR).
- (22) Date de dépôt international : 6 septembre 2002 (06.09.2002)
- (74) Mandataires : BECKER, Philippe etc.; Cabinet Becker et Associés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).
- (25) Langue de dépôt : français
- (30) Données relatives à la priorité : 01/11598 7 septembre 2001 (07.09.2001) FR; 02/10205 12 août 2002 (12.08.2002) FR
- (81) États désignés (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,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR AA4RP ASSAY

(54) Titre : COMPOSITIONS ET METHODES POUR LE DOSAGE DE L'AA4RP



A = ASSAY ACCORDING TO THE RANGE PEPTIDE
B = ASSAY ACCORDING TO THE RANGE PLASMA
C = PATIENT NUMBER

(57) Abstract: The invention concerns compositions and methods for assay or detection of Apolipoprotein A IV Related Protein in samples. In particular, the invention concerns a method for directly measuring AA4RP in biological samples. The invention also concerns synthetic products of AA4RP, corresponding antibodies and kits containing them, and their uses for detecting, quantifying AA4RP in a sample, or for quantifying atherogenic and non atherogenic lipoparticles in a sample.

[Suite sur la page suivante]



WO 03/023408 A1

WO 03/023408 A1 

LR, LS, LI, 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, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications. sera republiée si des modifications sont reçues

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet carasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HE, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv) pour US seulement

(57) Abrégé : La présente invention concerne des compositions et méthodes pour le dosage ou la détection de AA4RP (Apolipoprotein A IV Related Protein) dans des échantillons. Elle concerne notamment une méthode permettant de mesurer de façon directe l'AA4RP dans des échantillons biologiques. Cette invention concerne également les produits synthétiques de l'AA4RP, les anticorps correspondants et kits les comprenant, ainsi que leurs utilisations pour détecter, quantifier l'AA4RP dans un échantillon, ou encore quantifier les lipoparticules athérogènes et non athérogènes dans un échantillon.

WO 03/023408

PCT/FR02/03041

Compositions et méthodes pour le dosage de l'AA4RP

5 La présente invention concerne des compositions et méthodes pour le dosage ou la détection de « l'Apolipoprotein AIV related protein » (AA4RP). Elle concerne notamment une méthode permettant de détecter et de quantifier de façon directe l'AA4RP. Cette invention concerne également des produits synthétiques de l'AA4RP, les anticorps correspondants, les kits les comprenant, et leurs utilisations pour détecter et quantifier l'AA4RP dans un échantillon biologique.

10

L'augmentation des niveaux des triglycérides plasmatiques est l'un des déterminants majeurs dans le développement des maladies cardiovasculaires responsables actuellement de la majorité des décès dans le monde (Hokanson and Austin 1996). Des études ont montré que les altérations du niveau ou de la structure des apolipoprotéines sont liées à des niveaux anormaux de lipides et à une augmentation du risque d'athérosclérose (Rubin, Krauss et al. 1991; Plump, Smith et al. 1992; Duverger, Tremp et al. 1996; Huang, Liu et al. 1998; Lusi 2000; Rubin and Tall 2000). Un exemple très pertinent de l'implication des apolipoprotéines dans l'homéostasie des triglycérides plasmatiques est celui de l'AA4RP. Cette apolipoprotéine a été découverte récemment et a été décrite comme étant un facteur important dans la régulation du métabolisme des triglycérides chez la souris et chez l'homme (Pennacchio, Olivier et al. 2001). Des souris exprimant le transgène AA4RP humain montrent une diminution du niveau des triglycérides plasmatiques de 3 fois par rapport aux souris contrôles. Inversement, des souris knockout n'ayant pas le gène codant pour l'AA4RP présentent une concentration des triglycérides plasmatiques augmentée de 4 fois par rapport aux souris contrôles. Les variations du niveau des triglycérides observées chez les souris transgéniques et chez les souris knockout AA4RP vont dans le même sens que celles du niveau de l'apolipoprotéine CIII (Apo CIII), connue comme étant un indicateur positif des niveaux des triglycérides, puisque cette apolipoprotéine inhibe l'hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase (LpL). La concentration plasmatique de l'Apo CIII est diminuée chez les souris transgéniques AA4RP humaine après un régime riche

20
25
30

en lipides alors que la concentration de l'Apo CIII chez les souris knockout est augmentée, indiquant que l'un des mécanismes d'action de l'AA4RP pourrait être la régulation de l'expression du gène codant pour l'Apo CIII et confirmant ainsi le rôle positif de l'AA4RP dans l'élimination des triglycérides.

5 Chez l'homme, il a été démontré qu'il existe une corrélation très étroite entre le polymorphisme de l'AA4RP et le niveau des triglycérides. En effet, les allèles mineurs SNPs1-3 du polymorphisme de l'AA4RP sont associés avec des niveaux élevés de triglycérides. Un résultat représentatif est l'augmentation de 30% du niveau des triglycérides chez des individus possédant l'un de ces
10 allèles comparés aux sujets homozygotes pour l'allèles sauvage (Pennacchio, Olivier et al. 2001).

Les résultats obtenus chez la souris et chez l'homme montrent
15 clairement l'importance du rôle de l'AA4RP dans l'homéostasie des triglycérides et ils suggèrent une possible utilisation de l'AA4RP comme marqueur dans le pronostic ou le diagnostic des hypertriglycéridémies. Il s'avère donc particulièrement pertinent de développer une méthode permettant de détecter et/ou de quantifier l'AA4RP.

20 Pour différentes raisons, la mesure de la concentration plasmatique de l'AA4RP est assez difficile à réaliser. En premier lieu, l'AA4RP montre 27% d'identité et 48% de similarité avec l'apolipoprotéine AIV (Apo AIV). En second lieu, l'AA4RP est présente à très faible concentration dans le plasma. Il était donc primordial de développer une méthode spécifique et sensible pour
25 quantifier et/ ou détecter cette apolipoprotéine.

Cette protéine présente la structure primaire représentée ci-dessous, comprenant 366 acides aminés (SEQ ID NO : 1).

30 MASMAAVLTWALALLSAFSATQARKGFWDYFSQTSQDKGRVEQIHQQKMAR
EPATLKDSLEQDLNMMNKFLKLRPLSGSEAPRLPQDPVGMRRQLQEELEEV
KARLQPYMAEAHELVGWNLGLRQQLKPYTMDLMEQVALRVQELQQLRVV
GEDTKAQLLGGVDEAWALLQGLQSRVVHHTGRFKELFHPYAESLVSGIGRHV

WO 03/023408

3

PCT/FR02/03041

QELHRSVAPHAPASPARLSRCVQLSRKLTLLKAKALHARIQQNLDQLREELSR
AFAGTGTGEEGAGPDPQMLSEEVQRQLQAIFRQDYLQIAAFTRAIQDQETEEVQ
QQLAPPPPGHSAFAPEFQQTDSGKVLKSLQARLDDLWEDITHSLHDQGHSHL
GDP.

5

Cette protéine correspond à la séquence de la protéine RAP3 mentionnée antérieurement comme potentiellement impliquée dans la régénération hépatique (numéro d'accès Genbank : AF202889.1 : Van der Vliet H.N., Groenink M., Leegwater A.C.J. and Chamuleau R.A.F.M. Submitted (09-NOV-1999) Experimental Hepatology, Academic Medical Center, Meibergdreef 9, Amsterdam 1105 AZ, Netherlands). Elle correspond également à la protéine AA4RP (« Apolipoprotein AIV-Related Protein ») de la demande de brevet international WO01/00803 A2 (SEQ ID NO : 3 de cette demande).

10

15

La présente invention fournit une stratégie pour produire un peptide synthétique spécifique de l'AA4RP (qui sert à la production d'anticorps spécifiques anti-AA4RP) et une nouvelle méthode immuno-enzymatique permettant de détecter et de quantifier de façon directe cette apolipoprotéine. La quantification de l'AA4RP est réalisée avantageusement par la technique ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbant Assay) de type sandwich. L'anticorps anti-AA4RP est fixé sur un substrat solide pour la capture de la protéine, puis le même anticorps, cette fois-ci marqué par une enzyme, est utilisé comme anticorps de détection de l'AA4RP fixé par le premier anticorps. La phase de détection est effectuée en présence d'un substrat de l'enzyme et l'importance de la réaction développée entre l'enzyme et son substrat est directement proportionnelle à la concentration de l'AA4RP. Pour détecter, quantifier ou purifier l'AA4RP à l'aide d'anticorps spécifiques anti-AA4RP, on peut utiliser soit des anticorps polyclonaux, soit des anticorps monoclonaux ou un mélange de ces derniers.

20

25

30

L'invention décrit également de tels anticorps, des kits les comprenant et leurs utilisations pour détecter, quantifier ou purifier l'AA4RP dans des échantillons, notamment le sérum ou le plasma. Ces anticorps fournissent

également une nouvelle approche pour moduler l'activité de l'AA4RP in vitro ou in vivo, et pour réguler le métabolisme lipidique chez un sujet.

5 Un premier objet particulier de l'invention concerne un peptide synthétique spécifique de l'AA4RP substantiellement pur, comprenant la séquence SEQ ID NO : 2 ou un fragment immunogène ou un dérivé de ce peptide.

10 Un autre objet de l'invention concerne une méthode de production d'anticorps anti-AA4RP comprenant une étape d'immunisation à l'aide d'un peptide synthétique spécifique de l'AA4RP tel que défini ci-dessus. Cette invention comprend également les anticorps préparés selon cette méthode, de même que, plus généralement, les anticorps capables de lier un peptide tel que défini ci-dessus ainsi que les fragments ou dérivés de tels anticorps.

15 Un autre aspect de cette invention concerne une méthode de détection ou de dosage de l'AA4RP dans des échantillons biologiques (notamment dans des lipoparticules préparées ou dans des échantillons de plasma entier ou de sérum), à l'aide d'un anticorps (incluant un fragment ou un dérivé de ce dernier) tel que défini ci-dessus.

20 Un autre objet de cette invention concerne une méthode de détection de la présence d'une prédisposition ou d'un risque de développer un désordre lié au métabolisme des lipides chez un sujet, comprenant la détection in vitro, dans un échantillon dudit sujet, de l'AA4RP à l'aide d'un anticorps (incluant un fragment ou un dérivé de ce dernier) tel que défini ci-dessus.

30 Un autre objet de cette invention concerne une méthode de détection ou de suivi chez un sujet de la capture cellulaire de lipoprotéines riches en triglycérides et des HDL, comprenant la détection in vitro de particules contenant de l'AA4RP à l'aide d'un anticorps (incluant un fragment ou un dérivé de ce dernier) tel que défini ci-dessus.

Un autre objet de l'invention concerne une méthode de détection et/ou de suivi de la formation, du développement ou de la progression de l'athérosclérose chez un sujet, comprenant la détection in vitro, dans un échantillon dudit sujet, de la quantité ou du niveau d'AA4RP à l'aide d'un anticorps (incluant un fragment ou un dérivé de ce dernier) tel que décrit ci-dessus.

Le sujet est généralement un mammifère, de préférence un être humain, de façon encore plus préférée un sujet présentant un risque de développer des maladies cardiovasculaires liées à une dyslipidémie (plus préférée une hypertriglycéridémie) comme une maladie coronarienne par exemple.

Un autre objet de cette invention concerne une composition pharmaceutique comprenant un anticorps (incluant un fragment ou un dérivé de ce dernier) tel que défini ci-dessus et un excipient ou un véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique.

Peptides Spécifiques

Comme indiqué ci-dessus, un aspect de la présente invention concerne un peptide synthétique spécifique de l'AA4RP substantiellement pur comprenant la séquence SEQ ID NO : 2 ou un fragment immunogène ou un dérivé de ce peptide. Le terme « substantiellement pur » indique que le peptide est essentiellement dépourvu de séquences d'acides aminés présentes dans l'Apo AIV et/ou de protéines contaminantes normalement présentes ou associées à des lipoparticules, telles que notamment l'Apo AI. Le terme « synthétique » indique que le peptide n'est pas une molécule obtenue de façon naturelle mais qu'il a été préparé grâce à un procédé artificiel (e.g., synthèse chimique, assemblage, etc.) notamment tel que décrit dans les exemples. Dans ce contexte, le peptide synthétique spécifique de l'AA4RP de l'invention est préférentiellement essentiellement non-glycosylé. Un peptide selon l'invention comprend généralement moins de 200 acides aminés, plus préférentiellement

moins de 150 acides aminés, encore plus préférentiellement moins de 120 acides aminés.

5 La présente invention démontre à présent que des peptides synthétiques spécifiques de l'AA4RP peuvent être produits et utilisés pour générer des anticorps anti-AA4RP spécifiques. L'invention démontre par ailleurs que de tels anticorps sont capables de se lier de façon spécifique à l'AA4RP obtenue soit de façon naturelle soit sous la forme d'un antigène soluble, soit incluse dans des lipoparticules. L'invention démontre également 10 que de tels anticorps peuvent se lier à différentes lipoparticules contenant de l'AA4RP (VLDL et HDL). Ces peptides synthétiques spécifiques de l'AA4RP et leurs anticorps correspondants représentent ainsi de nouveaux produits particulièrement avantageux pour détecter l'AA4RP et quantifier de façon spécifique cette apolipoprotéine.

15 Plus particulièrement, un peptide synthétique spécifique de l'AA4RP préféré de l'invention comprend la séquence SEQ ID NO : 2, telle que décrite ci-dessous, ou un fragment immunogène ou un dérivé de ce peptide.

20 SEQ ID NO : 2

ATQARKGFWD YFSQTSGDKG RVEQIHQQKM AREPATLKDS
LEQDLNNMNK FLEKLRPLSG SEAPRLPQDP VGMRRQLQEE
LEEVKARLQP YMAEA

25 Ce fragment peptidique de 95 acides aminés correspond aux résidus 20 à 114 de la séquence de l'AA4RP humaine mature.

30 Comme illustré dans les exemples, ce peptide (comprenant la séquence SEQ ID NO : 2) peut être préparé de façon particulièrement avantageuse par synthèse en phase solide, plus particulièrement en utilisant une stratégie Boc/Bzl (Merrifield 1963).

Le terme « dérivé » inclut des peptides comprenant une ou plusieurs mutations, substitutions, délétions et/ou additions d'un ou de plusieurs résidus d'acides aminés et présentant substantiellement la même spécificité antigénique. Des exemples typiques de dérivés incluent des variations de séquence dues au polymorphisme de l'AA4RP, à l'épissage, etc.. Des dérivés particulièrement préférés comprennent une séquence SEQ ID NO : 2 ou une séquence modifiée comprenant au plus 5 résidus d'acides aminés distincts de ceux présents dans la SEQ ID NO : 2. Les résidus additionnels peuvent correspondre à des résidus de séquence de transport ou de liaison, à des groupes protecteurs, etc.. De plus, le peptide peut être modifié par exemple, par voie chimique, physique et/ou enzymatique, de manière à augmenter sa stabilité, augmenter son immunogénicité ou encore incorporer un « Tag » ou toute autre molécule chariot ou un marqueur, etc.. Des exemples de telles modifications incluent une glycosylation, l'addition d'un chariot, d'un marqueur (e.g., marquage radioactif ou enzymatique, etc.), etc..

Le terme « fragment » désigne tout peptide comprenant de 5 à 95 résidus consécutifs de la séquence SEQ ID NO : 2, de préférence de 10 à 95. Le terme « fragment » inclut toute portion de la séquence SEQ ID NO : 2 comprenant un épitope.

Un objet particulier de l'invention concerne un peptide synthétique spécifique de l'AA4RP caractérisé en ce qu'il comprend des épitopes spécifiques de l'AA4RP et en ce qu'il est dépourvu d'épitopes spécifiques de l'Apo AIV, et en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO : 2 ou un fragment ou dérivé de ces séquences.

Les peptides peuvent être solubles, purifiés ou complexés à une molécule porteuse, telle que KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) ou la sérum albumine par exemple, ou encore toute autre molécule inerte (e.g., synthétique) telle qu'une bille, etc.. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, les peptides sont couplés à une molécule porteuse. Ils le sont en particulier dans le cadre de leur utilisation pour produire des anticorps. Le couplage peut être

réalisé selon des méthodes conventionnelles connues de l'homme du métier (Vaitukaitis, Robbins et al. 1971) (Bassiri 1979).

5 Les peptides peuvent également être conjugués ou couplés à une molécule polypeptidique hétérologue, telle qu'une molécule biologiquement active par exemple. Le caractère hétérologue désigne tout peptide qui n'est pas originaire d'une molécule AA4RP.

10 Un objet particulier de l'invention concerne une composition caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide synthétique comprenant la séquence SEQ ID NO : 2, et en ce qu'elle est dépourvue d'autres protéines et en particulier des apolipoprotéines.

15 Les peptides peuvent être utilisés dans le cadre de méthodes de criblage pour des essais de titration, comme contrôles, standards ou pour calibrer des essais. Ils peuvent également être utilisés pour moduler l'activité de l'AA4RP. Ils sont également particulièrement utiles pour produire des anticorps anti-AA4RP.

20 Anticorps

A cet égard, un autre objet de l'invention concerne tout anticorps capable de se lier à un peptide tel que défini ci-dessus. L'anticorps peut être polyclonal ou monoclonal. De plus, le terme anticorps inclut également tous
25 fragments et dérivés d'anticorps, en particulier les fragments et dérivés desdits anticorps monoclonaux ou polyclonaux présentant substantiellement la même spécificité antigénique. Ces derniers comprennent des fragments d'anticorps (e.g., Fab, F(ab')₂, CDRs, etc.), des anticorps humanisés, des anticorps polyfonctionnels, des anticorps monocaténaires (ScFv), etc.. Les anticorps de
30 l'invention peuvent être produits à l'aide de méthodes conventionnelles, comprenant l'immunisation d'un animal et la récupération de son sérum (polyclonal) ou de cellules spléniques (de manière à produire des hybridomes par fusion avec des lignées cellulaires appropriées).

Des méthodes de production d'anticorps polyclonaux à partir d'espèces variées incluant les souris, les rongeurs, les primates, les chevaux, les cochons, les lapins, la volaille, etc. sont décrites par exemple dans Vaitukaitis et al. (Vaitukaitis, Robbins et al. 1971). L'antigène est combiné avec un adjuvant (e.g., adjuvant de Freund) et administré à un animal, typiquement par injection sous-cutanée. Des injections répétées peuvent être réalisées. Les échantillons sanguins sont collectés et l'immunoglobuline ou le sérum sont séparés.

Des méthodes de production d'anticorps monoclonaux à partir de différentes espèces peuvent être trouvées par exemple dans Harlow et al. (Harlow 1988) ou dans Kohler et al. (Kohler and Milstein 1975). Ces méthodes comprennent l'immunisation d'un animal avec un antigène, suivie de la récupération des cellules spléniques qui sont ensuite fusionnées avec des cellules immortalisées, telles que des cellules de myélome. Les hybridomes résultant produisent des anticorps monoclonaux et peuvent être sélectionnés par dilutions limites de manière à isoler les clones individuels. Les anticorps peuvent également être produits par sélection de banques combinatoires d'immunoglobulines, telles que celles divulguées par exemple dans Ward et al. (Ward, Gussow et al. 1989).

Des anticorps préférés de l'invention sont préparés par immunisation à l'aide d'un peptide synthétique spécifique de l'AA4RP substantiellement pur tel que décrit ci-dessus, comprenant de préférence la séquence SEQ ID NO : 2 ou un fragment immunogène ou un dérivé de ce peptide, e.g., un sous-fragment comprenant au moins un épitope.

Les fragments Fab ou F(ab')₂ peuvent être produits par digestion à l'aide d'une protéase selon les techniques conventionnelles. Les anticorps humanisés peuvent être préparés selon l'une des méthodes décrites, par exemple, dans Riechmann et al. (Riechmann 1988) (Jones 1986).

L'invention concerne également une méthode de production d'anticorps anti-AA4RP, comprenant l'injection d'un peptide de séquence SEQ ID NO : 2 ou un fragment immunogène ou un dérivé de ce peptide à un animal non-humain et la récupération des anticorps ou des cellules productrices d'anticorps. La méthode permet avantageusement la production d'anticorps spécifiques. La spécificité peut être vérifiée par la démonstration de l'absence d'une réaction croisée avec d'autres protéines circulantes sanguines. Plus généralement, la spécificité indique que les anticorps sont capables de se lier à l'AA4RP avec une affinité supérieure à tout autre antigène. Comme illustré dans les exemples, les anticorps polyclonaux de la présente invention peuvent être utilisés pour détecter et/ou doser l'AA4RP avec une grande efficacité.

Les anticorps peuvent être couplés à des fragments hétérologues tels que des toxines, des marqueurs, des médicaments ou tout autre agent thérapeutique, de façon covalente ou non, soit directement, soit par l'intermédiaire d'agents de couplage. Les marqueurs peuvent être choisis parmi les radio-marqueurs, des enzymes, des agents fluorescents, des particules magnétiques, etc.. Des toxines préférées sont par exemple la toxine diphtérique, la toxine botulique, etc.. Les médicaments ou les agent thérapeutiques sont choisis notamment parmi des lymphokines, des antibiotiques, des séquences anti-sens, des facteurs de croissance, etc.. Des méthodes permettant de réaliser le couplage des anticorps et de tels fragments hétérologues sont illustrées par exemple dans le brevet US 4,277,149 et dans le brevet US 3,996,345.

Les anticorps de l'invention possèdent de nombreuses applications incluant des applications thérapeutiques, prophylactiques, diagnostiques, de purification, de détection, etc..

In vitro, ils peuvent être utilisés comme agents de criblage ou pour purifier des antigènes provenant d'échantillons divers, incluant des échantillons biologiques variés (e.g., des échantillons sanguins). Ils peuvent également être utilisés pour détecter ou quantifier la présence ou la quantité d'AA4RP dans les

lipoparticules au sein d'un échantillon collecté à partir d'un sujet, typiquement, un échantillon sanguin provenant d'un mammifère ou, de manière préférée, d'un être humain.

5 Détection / Dosage

A cet égard, un autre objet de l'invention concerne une méthode de
détection, mesure, dosage ou quantification de l'AA4RP au sein d'un
échantillon biologique, comprenant la mise en contact de l'échantillon avec un
10 anticorps tel que défini ci-dessus (incluant des fragments ou des dérivés de ce
dernier) et la détection, mesure, dosage ou quantification (de la présence) de
complexes immuns antigène-anticorps. Typiquement cette méthode permet la
détermination des niveaux d'AA4RP dans un échantillon, par comparaison à
des conditions standards ou à une courbe de calibration par exemple.

15 La détermination des complexes Immuns peut être réalisée à l'aide de
techniques conventionnelles telles que des méthodes immunologiques directes
ou compétitives, par exemple la technique RIA (Radio Immuno Assay), EIA
(Electro Immuno Assay), par néphélobimétrie, turbidimétrie, immunoblot
20 quantitatif, calorimétrie, interférométrie, résonance de surface, mesure de
champ de force, autres biosenseurs en développement, etc.. Cependant, un
objet particulièrement préféré de l'invention concerne une méthode impliquant
la technique ELISA de type sandwich. En effet, comme indiqué ci-dessus, les
anticorps sont spécifiques et peuvent reconnaître l'AA4RP dans un échantillon
25 permettant ainsi de doser de façon précise, sensible et efficace l'AA4RP avec
un anticorps polyclonal (ou un mélange d'anticorps monoclonaux) anti-AA4RP.

Un objet plus préféré de l'invention concerne donc une méthode de
détection, mesure, dosage ou quantification de l'AA4RP au sein d'un
30 échantillon biologique, comprenant la mise en contact de l'échantillon (ou de
dilutions de celui-ci) avec un premier anticorps immobilisé sur un support, dit
anticorps de capture, cet anticorps étant tel que défini ci-dessus (incluant des
fragments ou des dérivés de ce dernier), et la révélation des complexes

immuns antigène-anticorps éventuellement formés au moyen d'un deuxième anticorps marqué, dit anticorps de révélation, cet anticorps étant tel que défini ci-dessus (incluant des fragments ou des dérivés de ce dernier).

5 Dans un mode particulièrement préféré, l'anticorps de capture et l'anticorps de révélation sont des anticorps polyclonaux. Ils peuvent s'agir du même anticorps polyclonal. L'anticorps de capture peut être immobilisé sur tout type de support, notamment plastique, tel qu'une plaque, bille, colonne, gel, etc.. Il s'agit avantageusement d'une plaque multi-puits. L'immobilisation est typiquement réalisée par adsorption des anticorps sur la surface des puits. Il est 10 entendu que toute autre technique de dépôt peut être mise en œuvre, directe ou indirecte, covalente ou non. L'anticorps de capture est utilisé typiquement sous forme soluble. Il est préalablement marqué pour permettre sa détection et sa quantification. Le marquage peut être de nature variée, comme un marquage 15 radioactif, fluorescent, enzymatique, luminescent, etc.. Dans un mode particulier de mise en œuvre, le marquage est un marquage enzymatique, et les complexes immuns sont révélés par mesure de l'activité enzymatique. Un exemple spécifique de marquage enzymatique est la peroxydase, dont l'activité peut être révélée en présence du substrat OPD par exemple.

20 Un objet particulièrement préféré de l'invention concerne une méthode de détection, mesure, dosage ou quantification de l'AA4RP au sein d'un échantillon biologique, comprenant la mise en contact de l'échantillon (ou de dilutions de celui-ci) avec un support sur lequel est immobilisé un anticorps de 25 capture polyclonal tel que défini ci-dessus, dans des conditions propices à la réalisation de complexes immuns spécifiques, et la révélation des complexes immuns antigène-anticorps éventuellement formés au moyen d'un anticorps de révélation polyclonal marqué, cet anticorps polyclonal étant tel que défini ci-dessus.

30 La méthode peut être réalisée sur différents échantillons biologiques, incluant du plasma, du sérum, du fluide interstitiel, du surnageant de cultures cellulaires, etc.. L'échantillon peut être collecté chez un sujet (e.g., un sujet

humain) et utilisé directement pour l'essai. De manière alternative, l'échantillon peut être dilué et/ou stocké (par exemple sous forme congelée) pour être testé plus tard. L'invention permet également la mesure des concentrations d'AA4RP contenue dans les lipoparticules grâce à l'utilisation des anticorps anti-AA4RP spécifiques, avec une sensibilité, une reproductibilité et une répétabilité très élevées.

La détection peut être réalisée dans différentes conditions expérimentales, cliniques, épidémiologiques, pronostiques et diagnostiques. En particulier, la méthode peut être utilisée pour détecter la prédisposition de certains individus à développer des désordres liés au métabolisme des lipides.

Un objet particulier de l'invention concerne ainsi une méthode de détection de la présence d'une prédisposition ou d'un risque de développer un désordre lié au métabolisme des lipides chez un sujet, comprenant la détection *in vitro* ou la mesure *in vitro*, à partir d'un échantillon prélevé sur le sujet, de lipoparticules comprenant l'AA4RP, à l'aide d'un anticorps tel que défini ci-dessus (incluant des fragments ou des dérivés de ce dernier). Les niveaux d'AA4RP (par comparaison à une valeur moyenne chez les sujets normaux) peuvent être caractéristiques du risque élevé de développer des désordres liés au métabolisme des lipides.

Un autre objet de l'invention concerne une méthode de détection ou de suivi de la capture cellulaire des HDL et des lipoprotéines riches en triglycérides chez un sujet, comprenant la détection *in vitro* des quantités d'AA4RP présentes dans des lipoparticules, à l'aide d'un anticorps tel que défini ci-dessus (incluant des fragments ou des dérivés de ce dernier).

Un autre objet de l'invention concerne une méthode de suivi d'un traitement destiné à corriger des désordres liés au métabolisme des lipides chez un sujet, comprenant la détection des niveaux d'AA4RP *in vitro*, dans un échantillon provenant dudit sujet, à l'aide d'un anticorps tel que défini ci-dessus (incluant des fragments ou des dérivés de ce dernier), après l'administration

dudit traitement audit sujet. L'efficacité du traitement est corrélée au niveau d'AA4RP chez le sujet. Ces résultats peuvent être corrélés avec la capacité du traitement à réguler les niveaux ou l'activité de l'AA4RP ou encore la capacité à restaurer une activité ou un niveau normal de l'AA4RP chez un sujet.

5

Un autre objet de l'invention concerne une méthode d'évaluation de l'état physiologique d'un sujet, e.g. le niveau du métabolisme des lipides chez un sujet, comprenant la détection des niveaux de l'AA4RP *in vitro* ou *ex vivo* dans un échantillon provenant dudit sujet, à l'aide d'anticorps tels que définis ci-dessus (incluant les fragments et les dérivés de ce dernier).

10

Comme indiqué ci-dessus, ces méthodes peuvent être réalisées sur différents échantillons (typiquement du plasma ou du sérum) et par RIA, EIA, néphélogéométrie, turbidimétrie immunoblot quantitatif, calorimétrie, interférométrie, résonance de surface, mesure de champ de force, autres biosenseurs en développement, etc..., ou de préférence grâce à un essai ELISA de type sandwich.

15

L'invention comprend en outre une composition pharmaceutique comprenant un anticorps tel que décrit ci-dessus et éventuellement un excipient ou un véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique.

20

Cette invention concerne également un kit comprenant un peptide ou un anticorps tel que décrit ci-dessus. Le kit peut être utilisé pour détecter ou quantifier l'AA4RP dans tout échantillon.

25

D'autres aspects et avantages de l'invention seront décrits dans les exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et ne limitent pas l'étendue de l'invention.

30

Légende des figures

Figure 1 :

Spécificité des anticorps.

Contrôle en SDS PAGE de la spécificité des anticorps anti-AA4RP et mise en évidence de la distribution de l'AA4RP dans les VLDL et les HDL.

5

Figure 2 :

Essai ELISA sur l'AA4RP

10

La Courbe de calibration est construite à partir des DO en fonction des concentrations du peptide 20-114 (◆), d'un plasma de sujets normolipidique (π) et des HDL préparées à partir de plasma de sujet normolipidique (●) selon le protocole indiqué dans l'exemple 3.

15

Figure 3 :

Concentrations plasmatiques de l'AA4RP calculées à partir d'une gamme peptide 20-114 ou d'un pool de plasma de sujets normolipidiques selon méthode ELISA

20

Figure 4 :

Dosage ELISA de l'AA4RP chez des souris C57 BL/6 des souris FVB non transgéniques, des souris knock-out (KO) AA4RP à fonds génétique FVB et des souris transgéniques pour l'AA4RP humaine (fonds génétique FVB).

25

EXEMPLES

30

Exemple 1 : Séquence peptidique

1. Choix de la séquence peptidique appropriée
-

Le fragment peptidique suivant a été synthétisé. Ce fragment a été déterminé en utilisant différents algorithmes permettant de prédire la flexibilité, l'hydrophilicité, l'antigénicité, et les structures secondaires. Ce fragment de 95 acides aminés correspond aux résidus 20 à 114 de la séquence SEQ ID NO : 1.

5
ATQARKGFWD YFSQTSGDKG RVEQIHQQK AREPATLKDS
LEQDLNMMNK FLEKLRPLSG SEAPRLPQDP VGMRRQLQEE
LEEVKARLQP YMAEA

10 2. Synthèse peptidique.

Le peptide a été synthétisé par la méthode de synthèse en phase solide (Merrifield 1963) sur un synthétiseur automatique modèle ABI 431 A (Applied Biosystems Inc., Californie, USA) en utilisant une stratégie Boc/Bzl sur une résine MBHA 0,5 mmol (0,57 mmol/g). Chaque acide aminé a été couplé deux fois en présence de dicyclohexylcarbodiimide/hydroxybenzotriazole sans capping. Les groupes protecteurs de chaîne latérale sont les suivants : Arg(Ts), Asp(Ochex), Glu(Ochex), Lys(2-Cl-Z), His(Dnp), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Met(O), Trp(formyl) et Tyr(Br-Z).

20 Le groupe Dnp sur le résidu Histidine a été éliminé du peptide avant clivage à partir du support par traitement en présence de β -mercaptoéthanol 10%, diisopropyléthylamine 5% dans un milieu DCM pendant 2 heures puis dans un milieu NMP pendant 2 heures. La résine peptidyle a été traitée avec du TFA 50% dans un milieu DCM pendant 20 minutes pour éliminer l'acide aminé terminal Boc. Le peptide a été clivé de la résine et déprotégé simultanément selon une procédure à HF lente et rapide : la résine (1 g) a été traitée avec du HF anhydre (2,5 ml) en présence de p-crésol (0,75 g), p-thiocrésol (0,25 g) et de diméthylsulfure (0,5 ml) à 0°C.

30 3 heures après, le fluorure d'hydrogène et le diméthylsulfure ont été éliminés par évaporation sous vide et les scavengers résiduels et les produits secondaires ont été extraits avec de l'éther diéthylique. Les appareils de la

réaction ont été rechargés avec du p-crésol (0,75 g), du p-thiocrésol (0,25 g) et 10 ml de HF anhydre puis le mélange a été laissé en incubation à 0°C pendant 1 heure et demie. Le fluorure d'hydrogène a été éliminé par évaporation et le résidu a été mélangé en présence d'éther diéthylique. Le résidu a été filtré, lavé avec de l'éther diéthylique et extrait avec 200 ml d'une solution d'acide acétique aqueuse à 10% puis lyophilisé.

3. Spectrométrie de masse

La masse moléculaire a été déterminée en utilisant un spectromètre de masse à électrospray d'ions. Le spectre de l'électrospray a été obtenu en utilisant un appareil API (Perkin-Elmer-Sciex) sur un spectromètre de masse par électrospray d'ions à quadrupole simple, équipé avec un spray d'ions (électrospray assisté d'un nébuliseur) (Sciex, Toronto, Canada).

4. Immunisation

Le peptide a été émulsifié dans l'adjuvant complet de Freund et injecté par voie sous-cutanée à des lapins en utilisant 0,5 mg de peptide par injection pour les deux premières injections, suivi à 15 jours d'intervalle d'injections de rappel dans le même adjuvant mais en utilisant 0,25 mg de peptide seulement.

Exemple 2 : Isolement et caractérisation des anticorps de lapin anti-AA4RP spécifiques.

1. Isolement des anticorps anti-AA4RP

Les anticorps polyclonaux ont été isolés par précipitation avec 27% de sulfate de sodium puis purifiés par chromatographie d'affinité sur gel de sépharose 4B activé (pharmacia, Uppsala, Suède), couplé avec le peptide de l'AA4RP résidu 20 à 114 AA (Axen, Porath et al. 1967). Les protéines non retenues sur le gel antigénique ont été éliminées par lavage avec une solution saline tamponnée phosphate (PBS : Phosphate 50 mmol/L, pH 7,2, NaCl 150

mmol/L). Les fractions non liées de manière spécifique sur le gel AA4RP ont été éliminées par 25 mmol/L de PBS. L'éluion des IgG polyclonales spécifiques de l'AA4RP a été accomplie en utilisant la glycine 0,2 M à pH 2,8. Les anticorps purifiés ont été dialysés immédiatement contre 10 mmol/L de PBS puis concentrés par ultrafiltration en utilisant un système Amicon (seuil de coupure 100 kD) (Amicon, Beverly, USA), testés en terme de contenu en protéine (Lowry O.H. 1951), puis conservés par aliquotes de 1 ml (1 mg) à -30°C.

2. Analyse en Western Blot

2.1- Protocole :

La pureté et la spécificité de l'anticorps ont été testées en Western Blot (Towbin, Staehelin et al. 1979). Des particules VLDL, LDL et HDL humaines ont été soumises à une électrophorèse dénaturante sur gel SDS-PAGE (5 à 24%) puis transférées sur une membrane de nitrocellulose et mises à réagir avec l'anticorps anti-AA4RP humaine purifié. Les protéines immunoréactives ont été visualisées avec un anticorps polyclonal anti-IgG conjugué à la peroxydase de raifort (Sanofi-Diagnostics Pasteur, Mares-la-Coquette, France). Le développement de la réaction est effectué par chemiluminescence (Amersham, Pharmacia, Biotec).

2.2- Résultats

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 1. Il apparaît sur cette figure que la bande spécifique qui est révélée par l'anticorps anti-AA4RP est située entre les marqueurs de poids moléculaire 32,5 et 47,5 kDa.

2.3- Interprétation

Le résultat de l'immunoblot sur les différentes lipoprotéines humaines, montrent une localisation de l'AA4RP au niveau des VLDL et des HDL, avec une distribution très majoritaire au niveau des HDL.

La présence de l'AA4RP au niveau des VLDL expliquerait le rôle de cette apolipoprotéine dans la régulation du métabolisme de ces lipoprotéines riche en triglycérides, et donc la modulation de la concentration de ces lipides athérogènes.

La localisation de l'AA4RP au niveau des HDL est certainement en relation avec le rôle de ces particules dans le transport inverse du cholestérol. En effet la plupart des apolipoprotéines localisées au niveau des HDL sont des promoteurs de la captation du cholestérol des cellules périphériques par les HDL et de son retour vers le foie où il est éliminé.

Exemple 3 : Dosage ELISA de l'AA4RP (type sandwich)

1. Réactifs et matériels utilisés dans le cadre du test ELISA

1.1- Anticorps de capture

La solution mère de l'anti-AA4RP est concentrée à 1 mg/ml, le coating (fixation de l'anticorps dans les puits d'une plaque 96 puits) est effectué à 10 µg/ml, la dilution de l'anticorps est réalisée dans une solution phosphate saline (PBS 0,1M, NaCl 0,15 M, pH 7,2 à 7,4).

1.2- Anticorps de détection

Le même anticorps utilisé pour la capture est marqué à la peroxydase. Il est dilué au 1/5000 dans le tampon PBS 0,1 M contenant de la BSA à 1%.

1.3- Standard

Le peptide 20-114 est utilisé pour la construction de la gamme standard. La concentration du peptide est de 1 mg/ml.

Pour la construction d'une courbe de calibration, le standard doit être dilué dans une solution de PBS 0,1 M/BSA 1% selon le tableau ci-dessous :

Points	Concentration (ng/ml)
1	125,00
2	62,50
3	31,25
4	15,62
5	7,81
6	3,90
7	1,95
8	0,97
9	0,48
10	0,24
11	0,12

1.4- Préparation des échantillons

5

Les échantillons frais sont recommandés pour l'analyse. Les plasmas doivent être collectés grâce à des procédures établies et utilisées dans les laboratoires cliniques. Si besoin, le plasma peut être stocké entre 2 et 8°C jusqu'à une semaine. Les échantillons conservés congelés peuvent être utilisés pendant une plus longue période.

10

Les échantillons sont dilués selon leur origine :

- Plasma de sujets normolipidiques : de 1,3 à 4 fois.
- Plasma de sujets hypertriglycéridémiques : de 2 à 16 fois.
- HDL préparées à partir de plasma par ultracentrifugation : de 4 à 128 fois.

15

Les dilutions sont effectuées dans une solution PBS/BSA 1%.

2. Protocole

- « Coating » : la solution d'anticorps de capture anti-AA4RP non marqué est incubée une nuit à température ambiante à raison de 100 µl/puits (plaque de microtitration de 96 puits).
- Lavage de la plaque : les anticorps non fixés sur la plaque sont éliminés par 4 lavages de la plaque de microtitration avec du PBS 0,1M.
- Dépôt des échantillons et de la gamme standard : Les préparations de la gamme de peptide, des plasma humains ou des HDL sont déposées à raison de 100 µl par puits, puis sont incubées à 37°C pendant 2 heures.
- Lavage : l'excès du peptide, de l'AA4RP des échantillons biologiques qui n'est pas fixé par l'anti-AA4RP de capture est éliminé par 4 lavages successives de la plaque de microtitration.
- Détection : la détection est effectuée par l'anti-AA4RP marqué à la peroxydase dilué au 1/5000 dans du PBS/BSA 1%. 100 µl de la préparation est déposé par puits de la plaque de microtitration. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 2 heures.
- Lavage : l'excès de l'anticorps anti-AA4RP de détection est éliminé par 4 lavages successives de la plaque par du PBS 0,1M.
- Développement de la réaction enzymo-colorimétrique : réalisée par ajout de 100 µl de substrat α -Phénylène diamine dihydrochloride (OPD) par puits, ensuite la réaction est développée pendant 30 minutes à l'obscurité.
- Arrêt de la réaction : par ajout de 100 µl d'HCl 1N par puits.
- Lecture de l'absorbance : est effectuée par un spectrophotomètre à la longueur d'onde 492 nm.

3. Résultats et interprétations

3.1- Courbe de calibration

La courbe de calibration est construite selon une fonction à quatre inconnues représentant la croissance de la densité optique en fonction de la concentration des différentes dilutions de la gamme standard. Elle montre une allure sigmoïde caractéristique du dosage immuno-enzymatique ELISA (Figure 2).

Les courbes représentatives des différentes dilutions du peptide 20-114, du plasma normolipidique et des HDL humaines sont confondues, indiquant que l'anti-AA4RP reconnaît avec la même affinité le peptide synthétique et l'AA4RP native dans un plasma ou dans des lipoprotéines humaines. En plus, le dosage de l'AA4RP chez plusieurs sujets utilisant une gamme de calibration construite soit à partir du peptide soit à partir d'un pool de plasmas humains, donne des résultats de la concentration de l'AA4RP significativement similaires (Figure 3).

3.2- Intervalle de travail et seuil de détection

Il est d'environ 2 Log, entre 1 et 62 ng/ml, ce qui permet de doser des échantillons dont les concentrations en AA4RP sont très variables. Le seuil de détection est d'environ 1 ng/ml, ce qui indique que le dosage est d'une très grande sensibilité.

3.3- Valeurs normales

Le dosage de l'AA4RP dans une population de sujets normolipidiques dont le taux des triglycérides ne dépasse pas 1 mg/ml donne des valeurs de la concentration de l'apolipoprotéine entre 8,94 et 29,44 ng/ml.

Exemple 4 : Corrélation entre la concentration de l'AA4RP des différents compartiments plasmatique et le niveaux des triglycérides totaux

1. Protocole

Les corrélations des niveaux triglycérides plasmatiques avec les niveaux de l'AA4RP plasmatique ou de l'AA4RP dans les lipoprotéines non HDL (VLDL, IDL et LDL) ou de l'AA4RP des lipoprotéines HDL sont réalisées chez une population dont les taux des triglycérides sont compris entre 0,5 et 4 mg/ml.

1.1- Préparation des lipoprotéines HDL et non HDL

Les lipoprotéine HDL et non HDL sont préparées par précipitation de ces dernières par addition d'acide phosphotungstique et de Mg^{2+} aux plasmas de différents sujets (précipitation sélective des lipoprotéines contenant l'Apo B, soit les VLDL, IDL et LDL)(Burstein, Scholnick et al. 1970; Lopes-Virella, Stone et al. 1977). Brieèvement, le plasma est incubé pendant 10 minutes à température ambiante avec une solution de phosphotungstate, puis centrifugé à 2500 rpm pendant 15 minutes et enfin le surnageant contenant les HDL est séparé du culot contenant les lipoprotéines non HDL.

1.2- Dosage des triglycérides

Les triglycérides plasmatique sont dosées par la méthode enzymo-colorimétrique, contre une gamme standard, préparée grâce au calibrateur des lipides CFAS Réf. N° 759350 (Boehringer Mannheim GmbH, Allemagne). La gamme standard a été construite de 16 à 500 $\mu g/ml$. 100 μl de chaque dilution d'échantillon ou de gamme étalon sont déposés par puits d'une plaque de titration (96 puits). Ensuite 200 μl de réactifs triglycérides Réf. 701912 (Boehringer Mannheim GmbH, Allemagne) sont rajoutés dans chaque puits, et l'ensemble de la plaque est incubé pendant 30 min. à 37°C. La lecture des Densités Optiques (DO) est effectuée à 492 nm sur le spectrophotomètre. Les concentrations en triglycérides de chaque échantillon sont calculées après construction de la courbe étalon selon une fonction linéaire $y=ax+b$, où y représente les DO et x les concentrations en triglycérides.

1.3- Dosage de l'AA4RP totales, des lipoprotéines HDL et des lipoprotéines non HDL :

Les concentrations de l'AA4RP totales du plasma et celle des lipoprotéines HDL sont dosées selon le protocole de l'exemple 3. La concentration de l'AA4RP des lipoprotéines non HDL est calculée par différence entre la concentration de l'AA4RP totale plasmatique et celle des lipoprotéines HDL.

2.- Résultats et interprétations :

Nous n'avons pas observé de corrélation entre les niveaux plasmatiques de l'AA4RP est ceux des triglycérides totaux ou ceux des triglycérides des lipoprotéines non HDL. Par contre, il existe une corrélation négative significative entre la concentration de la protéine et celle des triglycérides des lipoprotéines HDL ($r=0,5$, $p<0,001$). Ceci indique que plus le niveau des triglycérides augmente, plus la quantité de l'AA4RP dans les HDL diminue, confirmant ainsi le rôle anti-athérogène des HDL et par conséquent celui de l'AA4RP présente dans ce type de lipoprotéines.

Exemple 5 : Quantification de l'AA4RP chez des souris transgéniques pour l'AA4RP humaines1.- Protocole :

Le niveau de l'AA4RP a été dosé chez des souris C57BL/6 normales, des souris FVB non transgéniques, des souris knock-out (KO) AA4RP à fonds génétique FVB et des souris transgéniques pour l'AA4RP humaine (fonds génétique FVB). Le protocole de dosage est identique à celui décrit dans l'exemple 3.

2.- Résultats et interprétations :

La figure 4 montre que notre dosage détecte l'AA4RP uniquement dans les souris transgéniques AA4RP humaine indiquant la spécificité de la méthode entre l'humain et la souris. Ceci est très intéressant, puisqu'il est possible de quantifier l'AA4RP exogène dans des modèles animaux modifiés sans contamination par celle endogène, ce qui permet de dissocier entre l'effet de l'AA4RP propre de l'animal et celle d'origine exogène.

REFERENCES

- 5 Axen, R., J. Porath, et al. (1967). "Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides." Nature **214**(95): 1302-4.
- Bassiri, R. M., Dvorak J. and Utiger R.D. (1979). Thyrotropin-releasing hormone. Methods of hormone radioimmunoassay. B. M. In: Jaffe, and Behrman H.R. (Eds). New York, New York Academic Press: p: 46.
- 10 Burstein, M., H. R. Scholnick, et al. (1970). "Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions." J Lipid Res **11**(6): 583-95.
- Duverger, N., G. Tremp, et al. (1996). "Protection against atherogenesis in mice mediated by human apolipoprotein A-IV." Science **273**(5277): 966-8.
- Harlow, E. a. L., D., Ed. (1988). Antibodies: a Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Publications.
- 15 Hokanson, J. E. and M. A. Austin (1996). "Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta- analysis of population-based prospective studies." J Cardiovasc Risk **3**(2): 213-9.
- 20 Huang, Y., X. Q. Liu, et al. (1998). "Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia." J Biol Chem **273**(41): 26388-93.
- Jones, P. T., Dear P. H., Foote J., Neuberger M. S. and Winter G. (1986). "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse." Nature **321**: 522-525.
- 25 Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495-7.
- Lopes-Virella, M. F., P. Stone, et al. (1977). "Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods." Clin Chem **23**(5): 882-4.
- 30 Lowry O.H., R. J., Farr A.L., and Randall R.J. (1951). "Protein measurement with folin phenol reagent." J. Biol. Chem. **193**: 265-275.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-41.
-

- Merrifield, R. B. (1963). "Solide phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide." *J. Am. Chem. Soc* **85**: 2149-2154.
- Pennacchio, L. A., M. Olivier, et al. (2001). "An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing." *Science* **294**(5540): 169-73.
- 5 Plump, A. S., J. D. Smith, et al. (1992). "Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E- deficient mice created by homologous recombination in ES cells." *Cell* **71**(2): 343-53.
- Riechmann, L., Clark M., Waldmann H. and Winter G. (1988). "Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma." *Nature* **332**: 323-327.
- 10 Rubin, E. M., R. M. Krauss, et al. (1991). "Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI." *Nature* **353**(6341): 265-7.
- Rubin, E. M. and A. Tall (2000). "Perspectives for vascular genomics." *Nature* **407**(6801): 265-9.
- 15 Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4.
- Vaitukaitis, J., J. B. Robbins, et al. (1971). "A method for producing specific antisera with small doses of immunogen." *J Clin Endocrinol Metab* **33**(6): 988-91.
- 20 Ward, E. S., D. Gussow, et al. (1989). "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli." *Nature* **341**(6242): 544-6.
- 25

REVENDEICATIONS

- 5 1. Peptide synthétique substantiellement pur, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2 ou un dérivé ou fragment immunogène de celle-ci.
- 10 2. Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que le peptide est soluble ou complexé à une molécule porteuse telle que KLH, la sérum-albumine ou une bille.
- 15 3. Anticorps spécifique d'un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2, ou fragment ou dérivé dudit anticorps présentant substantiellement la même spécificité antigénique.
- 20 4. Anticorps selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est produit par immunisation d'un animal non-humain avec un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2, et récupération des anticorps ou des cellules productrices des anticorps.
- 25 5. Anticorps selon l'une des revendications 3 ou 4, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps polyclonal.
6. Anticorps selon l'une des revendications 3 ou 4, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps monoclonal.
- 30 7. Méthode de production d'un anticorps anti-AA4RP spécifique, comprenant l'administration d'un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 à un animal non-humain et la récupération des anticorps ou des cellules productrices d'anticorps.
8. Méthode de détection de l'AA4RP dans un échantillon biologique comprenant la mise en contact de l'échantillon avec un anticorps selon l'une des revendications 3 à 6 ou avec un anticorps produit

grâce à une méthode selon la revendication 7, et la détection de la présence de complexes immuns antigène-anticorps.

- 5 9. Méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce que la présence d'un complexe immun antigène-anticorps est déterminée par EIA, RIA, néphélométrie, turbidimétrie, immunoblot quantitatif, calorimétrie, interférométrie, résonance de surface ou mesure de champ de force.
- 10 10. Méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce que la présence d'un complexe immun antigène-anticorps est déterminée par un test ELISA.
- 15 11. Méthode de quantification de l'AA4RP dans un échantillon biologique, comprenant la mise en contact dudit échantillon avec un anticorps selon l'une des revendications 3 à 6 ou avec un anticorps produit par une méthode selon la revendication 7, et la quantification des complexes immuns AA4RP-anticorps.
- 20 12. Méthode selon la revendication 11, caractérisée en ce que la quantification est réalisée par méthode ELISA.
- 25 13. Méthode selon l'une des revendications 8 à 12, caractérisée en ce que l'échantillon biologique est un échantillon de sang, de sérum, un fluide interstitiel ou un extrait tissulaire ou cellulaire.
- 30 14. Méthode de détection de la présence d'une prédisposition ou d'un risque de développer un désordre lié au métabolisme des lipides chez un sujet, comprenant la quantification *in vitro* ou *ex vivo* des niveaux de l'AA4RP dans un échantillon prélevé sur un sujet, avec un anticorps selon l'une des revendications 3 à 6, ou avec un anticorps produit par une méthode selon la revendication 7.

- 5 15. Méthode de suivi d'un traitement destiné à corriger des désordres liés au métabolisme des lipides chez un sujet, comprenant la mesure des quantités de l'AA4RP *in vitro* ou *ex vivo*, dans un échantillon provenant dudit sujet, à l'aide d'un anticorps selon l'une des revendications 3 à 6 ou d'un anticorps produit par une méthode selon la revendication 7.
- 10 16. Anticorps selon l'une des revendications 3 à 6 ou produit par une méthode selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'anticorps est couplé à un fragment hétérologue tel qu'une toxine, un marqueur, un médicament ou tout autre agent thérapeutique.
- 15 17. Composition pharmaceutique comprenant un anticorps selon l'une des revendications 3 à 6 et 16 ou produit par une méthode selon la revendication 7 et un excipient ou un véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique.
- 20 18. Kit comprenant un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 ou un anticorps selon l'une des revendications 3 à 6 et 16 ou produit par une méthode selon la revendication 7.

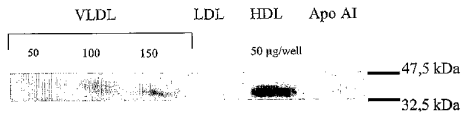


Figure 1

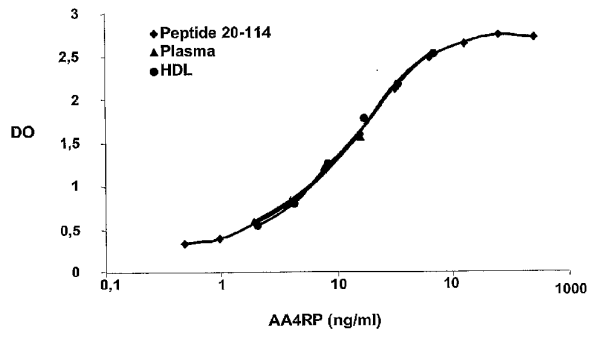


Figure 2

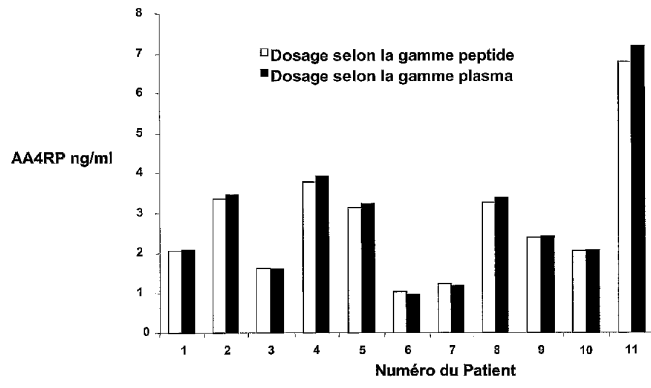


Figure 3

WO 03/023408

3/3

PCT/FR02/03041

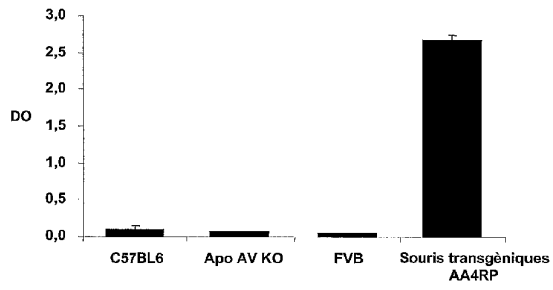


Figure 4

WO 03/023408

1/3

PCT/FR02/03041

LISTE DE SEQUENCES

<110> GENFIT SA

<120> Compositions et Methodes pour le dosage de l'AA4RP

<130> B0157WO

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 366

<212> PRC

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ser Met Ala Ala Val Leu Thr Trp Ala Leu Ala Leu Leu Ser
1 5 10 15Ala Phe Ser Ala Thr Gln Ala Arg Lys Gly Phe Trp Asp Tyr Phe Ser
20 25 30Gln Thr Ser Gly Asp Lys Gly Arg Val Glu Gln Ile His Gln Gln Lys
35 40 45Met Ala Arg Glu Prc Ala Thr Leu Lys Asp Ser Leu Glu Gln Asp Leu
50 55 60Asn Asn Met Asn Lys Phe Leu Glu Lys Leu Arg Prc Leu Ser Gly Ser
65 70 75 80Glu Ala Pro Arg Leu Pro Gln Asp Pro Val Gly Met Arg Arg Gln Leu
85 90 95Gln Glu Glu Leu Glu Glu Val Lys Ala Arg Leu Gln Pro Tyr Met Ala
100 105 110Glu Ala His Glu Leu Val Gly Trp Asn Leu Glu Gly Leu Arg Gln Gln
115 120 125Leu Lys Pro Tyr Thr Met Asp Leu Met Glu Gln Val Ala Leu Arg Val
130 135 140

WO 03/023408

2/3

PCT/FR02/03041

Gln Glu Leu Gln Gln Leu Arg Val Val Gly Glu Asp Thr Lys Ala
 145 150 155 160
 Gln Leu Leu Gly Gly Val Asp Glu Ala Trp Ala Leu Leu Gln Gly Leu
 165 170 175
 Gln Ser Arg Val Val His His Thr Gly Arg Phe Lys Glu Leu Phe His
 180 185 190
 Pro Tyr Ala Glu Ser Leu Val Ser Gly Ile Gly Arg His Val Gln Glu
 195 200 205
 Leu His Arg Ser Val Ala Pro His Ala Pro Ala Ser Pro Ala Arg Leu
 210 215 220
 Ser Arg Cys Val Gln Val Leu Ser Arg Lys Leu Thr Leu Lys Ala Lys
 225 230 235 240
 Ala Leu His Ala Arg Ile Gln Gln Asn Leu Asp Gln Leu Arg Glu Glu
 245 250 255
 Leu Ser Arg Ala Phe Ala Gly Thr Gly Thr Glu Glu Gly Ala Gly Pro
 260 265 270
 Asp Pro Gln Met Leu Ser Glu Glu Val Arg Gln Arg Leu Gln Ala Phe
 275 280 285
 Arg Gln Asp Thr Tyr Leu Gln Ile Ala Ala Phe Thr Arg Ala Ile Asp
 290 295 300
 Gln Glu Thr Glu Glu Val Gln Gln Gln Leu Ala Pro Pro Pro Gly
 305 310 315 320
 His Ser Ala Phe Ala Pro Glu Phe Gln Gln Thr Asp Ser Gly Lys Val
 325 330 335
 Leu Ser Lys Leu Gln Ala Arg Leu Asp Asp Leu Trp Glu Asp Ile Thr
 340 345 350
 His Ser Leu His Asp Gln Gly His Ser His Leu Gly Asp Pro
 355 360 365

<210> 2

<211> 95

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

WO 03/023408

3/3

PCT/FR02/03041

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: peptide
synthétique AAAP

<400> 2

Ala Thr Gln Ala Arg Lys Gly Phe Trp Asp Tyr Phe Ser Gln Thr Ser
1 5 10 15

Gly Asp Lys Gly Arg Val Glu Gln Ile His Gln Gln Lys Met Ala Arg
20 25 30

Glu Pro Ala Thr Leu Lys Asp Ser Leu Glu Gln Asp Leu Asn Asa Met
35 40 45

Asn Lys Phe Leu Glu Lys Leu Arg Pro Leu Ser Gly Ser Glu Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Pro Gln Asp Pro Val Gly Met Arg Arg Gln Leu Gln Glu Glu
65 70 75 80

Leu Glu Glu Val Lys Ala Arg Leu Cln Pro Tyr Met Ala Glu Ala
85 90 95

【手続補正書】

【提出日】平成15年6月19日(2003.6.19)

【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】

アミノ酸配列の配列番号2またはその免疫原性断片もしくは誘導体からなる実質的に純粋な合成ペプチド。

【請求項2】

5～95のアミノ酸、好ましくは10～95のアミノ酸からなる、請求項1記載のペプチド。

【請求項3】

可溶性であるか、または、K L H、血清アルブミンもしくはビーズのような担体分子と複合体を形成している、請求項1または2記載のペプチド。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか1項記載のペプチドの特異的な抗体または実質的に同じ抗原特異性を有する該抗体の断片もしくは誘導体。

【請求項5】

請求項1～3のいずれか1項記載のペプチドで非ヒト動物を免疫化し、抗体または抗体産生細胞を回収することより産生される、請求項4記載の抗体。

【請求項6】

ポリクローナル抗体である、請求項4または5記載の抗体。

【請求項7】

モノクローナル抗体である、請求項4または5記載の抗体。

【請求項8】

請求項1～3のいずれか1項記載のペプチドを非ヒト動物に投与し、抗体または抗体産生細胞を回収することを含む、特異的抗AA4RP抗体を産生するための方法。

【請求項9】

試料を、請求項4～7のいずれか1項記載の抗体と、または、請求項8記載の方法により産生された抗体と接触させ、抗原-抗体免疫複合体の存在を検出することを含む、生物学的試料中のAA4RPを検出するための方法。

【請求項10】

抗原-抗体免疫複合体の存在を、E I A、R I A、比濁分析、濁度法、定量イムノプロット、熱量測定、干渉分光計、表面共鳴、または力場測定により決定する、請求項9記載の方法。

【請求項11】

抗原-抗体免疫複合体の存在をE L I S A試験により決定する、請求項9記載の方法。

【請求項12】

試料を、請求項4～7のいずれか1項記載の抗体と、または請求項8記載の方法により産生される抗体と接触させ、AA4RP-抗体免疫複合体を定量することを含む、生物学的試料中のAA4RPを定量するための方法。

【請求項13】

定量をE L I S A法により行なう、請求項12記載の方法。

【請求項14】

生物学的試料が、血液、血清、間質液、または組織もしくは細胞抽出物の試料である、請求項9～13のいずれか1項記載の方法。

【請求項15】

被験者由来の試料中の A A 4 R P のレベルを、インビトロまたはエクソピボで、請求項 4 ~ 7 のいずれか 1 項記載の抗体、または請求項 8 記載の方法により産生される抗体を用いて定量することを含む、被験者における脂質代謝疾患の発症のリスクまたは素因の存在を検出するための方法。

【請求項 16】

被験者由来の試料中の A A 4 R P の量を、インビトロまたはエクソピボで、請求項 4 ~ 7 のいずれか 1 項記載の抗体、または、請求項 8 記載の方法により産生される抗体を用いて測定することを含む、被験者における脂質代謝疾患を直すための処置をモニタリングするための方法。

【請求項 17】

毒素、マーカー、医薬、または他の治療剤のような異種断片にカップリングしている、請求項 4 ~ 7 のいずれか 1 項記載の、または請求項 8 に記載の方法により産生される抗体。

【請求項 18】

請求項 4 ~ 7 および 17 のいずれか 1 項記載の、または請求項 8 記載の方法により産生される抗体、ならびに、薬学的に許容される賦形剤またはビヒクルを含む医薬組成物。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載のペプチドまたは請求項 4 ~ 7 のいずれか 1 項記載の、もしくは請求項 8 記載の方法により産生される抗体を含むキット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern Application No PCT/FR 02/03041										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/92 C07K14/47												
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) IPC 7 G01N C07K C12Q												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBL, 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	WO 00 37491 A (BOUGUELERET LYDIE ;DUMAS JEAN BAPTISTE (FR); GENSET SA (FR); DUCLE) 29 June 2000 (2000-06-29) page 90, paragraph 3 -page 91, paragraph 2	1-18										
X	WO 01 00803 A (BOUGUELERET LYDIE ;GENSET SA (FR); DUCLERT AYMERIC (FR); DUMAS MIL) 4 January 2001 (2001-01-04) cited in the application page 150, line 6 -page 163, line 27 page 27, last paragraph claim 12	1-18										
X	WO 00 03013 A (LEEGWATER ADAM CORNELIS JOZEF ;VLIET HENDRIK NIELS V D (NL); AMSTE) 20 January 2000 (2000-01-20) SEQ ID NO:24 claims 9-11	1-13, 16-18										
-/-												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.										
* Special categories of cited documents:												
<table border="0"> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*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)</td> <td>*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.</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>*B* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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	*E* earlier document but published on or after the international filing date	*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	*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)	*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.	*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*B* document member of the same patent family	*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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											
E earlier document but published on or after the international filing date	*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											
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)	*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.											
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*B* document member of the same patent family											
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report											
25 February 2003	04/03/2003											
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentstrasse 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Gundlach, B											

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor PCT/FR 02/03041
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 53486 A (GENENTECH INC ; PAN JAMES (US); STONE DONNA M (US); ASHKENAZI AVI J) 26 July 2001 (2001-07-26) claims 1-12	1-13, 16-18
P, X	WO 01 79446 A (GOODRICH RYLE ; HYSEQ INC (US); WANG DUNRUI (US); WEHRMAN TOM (US);) 25 October 2001 (2001-10-25) claims 11-14	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Inter	Application No
Information on patent family members				PCT/FR 02/03041	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 0037491	A	29-06-2000	AU 1675900	A	12-07-2000
			EP 1144444	A2	17-10-2001
			WO 0037491	A2	29-06-2000
			JP 2002539767	T	26-11-2002
			US 6455280	B1	24-09-2002
			AU 5559400	A	31-01-2001
			AU 5838200	A	31-01-2001
			AU 5838300	A	31-01-2001
			EP 1200576	A2	02-05-2002
			WO 0100806	A2	04-01-2001
			WO 0100661	A2	04-01-2001
			WO 0100803	A2	04-01-2001
WO 0100803	A	04-01-2001	AU 1675900	A	12-07-2000
			AU 5838300	A	31-01-2001
			EP 1144444	A2	17-10-2001
			WO 0100803	A2	04-01-2001
			JP 2002539767	T	26-11-2002
			US 6455280	B1	24-09-2002
			AU 5559400	A	31-01-2001
			AU 5838200	A	31-01-2001
			EP 1200576	A2	02-05-2002
			WO 0100806	A2	04-01-2001
			WO 0100661	A2	04-01-2001
			WO 0037491	A2	29-06-2000
WO 0003013	A	20-01-2000	EP 0976824	A1	02-02-2000
			AU 4910299	A	01-02-2000
			WO 0003013	A2	20-01-2000
WO 0153486	A	26-07-2001	AU 1748200	A	19-06-2000
			AU 1749900	A	12-07-2000
			AU 2192800	A	12-07-2000
			AU 2224800	A	28-09-2000
			AU 2399300	A	28-09-2000
			AU 2495200	A	28-09-2000
			AU 2596700	A	28-09-2000
			AU 2600800	A	28-09-2000
			AU 2879400	A	31-07-2001
			AU 2883600	A	28-09-2000
			AU 3072199	A	27-09-1999
			AU 3107700	A	28-09-2000
			AU 3381600	A	28-09-2000
			AU 3514400	A	28-09-2000
			CA 2321677	A1	16-09-1999
			CA 2361840	A1	14-09-2000
			CA 2361849	A1	14-09-2000
			CA 2362427	A1	14-09-2000
			EP 1173563	A1	23-01-2002
			EP 1263948	A2	11-12-2002
			EP 1159419	A1	05-12-2001
			EP 1220905	A2	10-07-2002
			EP 1135485	A2	26-09-2001
EP 1141284	A2	10-10-2001			
EP 1159422	A1	05-12-2001			
EP 1141289	A2	10-10-2001			
US 2002182673	A1	05-12-2002			
US 2002192209	A1	19-12-2002			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			International Application No.		
Information on patent family members			PCT/FR 02/03041		
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 0153486	A	US 2002119130	A1	29-08-2002	
		WO 0053753	A2	14-09-2000	
		WO 0053754	A1	14-09-2000	
		WO 0053755	A2	14-09-2000	
		WO 0153486	A1	26-07-2001	
		WO 0053756	A2	14-09-2000	
		WO 0053757	A2	14-09-2000	
		WO 0053758	A2	14-09-2000	
		US 2003004311	A1	02-01-2003	
		US 2002127584	A1	12-09-2002	
		US 2002094416	A1	18-07-2002	
		US 2003009012	A1	09-01-2003	
		US 2003009013	A1	09-01-2003	
		US 2003027992	A1	06-02-2003	
		US 2002183493	A1	05-12-2002	
		US 2003027993	A1	06-02-2003	
		US 2003027212	A1	06-02-2003	
US 2002183505	A1	05-12-2002			
WO 0179446	A	25-10-2001	AU 5362001	A	30-10-2001
		EP 1276754	A2	22-01-2003	
		WO 0179446	A2	25-10-2001	
		US 2002142953	A1	03-10-2002	
		AU 2728401	A	31-07-2001	
		AU 2734401	A	31-07-2001	
		AU 3265701	A	31-07-2001	
		EP 1242443	A1	25-09-2002	
		EP 1250346	A2	23-10-2002	
		WO 0153312	A1	26-07-2001	
		WO 0153453	A2	26-07-2001	
		WO 0153454	A2	26-07-2001	
		US 2002197679	A1	26-12-2002	
		US 2002146692	A1	10-10-2002	
		AU 3298901	A	07-08-2001	
		AU 3304101	A	07-08-2001	
		WO 0155442	A2	02-08-2001	
		WO 0154477	A2	02-08-2001	
		AU 6300501	A	26-11-2001	
		EP 1282635	A1	12-02-2003	
		WO 0187917	A1	22-11-2001	
WO 02059260	A2	01-08-2002			

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		Dem. internationale No PCT/FR 02/03041
A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 G01N33/92 C07K14/47		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01N C07K C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBL, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents clés, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 00 37491 A (BOUGUELERET LYDIE ;DUMAS JEAN BAPTISTE (FR); GENSET SA (FR); DUCLE) 29 juin 2000 (2000-06-29) page 90, alinéa 3 -page 91, alinéa 2 ---	1-18
X	WO 01 00803 A (BOUGUELERET LYDIE ;GENSET SA (FR); DUCLERT AYMERIC (FR); DUMAS MIL) 4 janvier 2001 (2001-01-04) cité dans la demande page 150, ligne 6 -page 163, ligne 27 page 27, dernier alinéa revendication 12 ---	1-18
X	WO 00 03013 A (LEEGWATER ADAM CORNELIS JOZEF ;VLIET HENDRIK NIELS V D (NL); AMSTE) 20 janvier 2000 (2000-01-20) SEQ ID NO:24 revendications 9-11 ---	1-13, 16-18
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent		*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou les traits constituant la base de l'invention
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date		*X* document particulièrement pertinent, l'inven. non revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
L document pouvant jouer un double sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquées)		*Y* document particulièrement pertinent, l'inven. non revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
C document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens		*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
25 février 2003	04/03/2003	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Gundlach, B	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		De internationale No PCT/FR 02/03041
C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Origine	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 01 53486 A (GENENTECH INC ; PAN JAMES (US); STONE DONNA M (US); ASHKENAZI AVI J) 26 juillet 2001 (2001-07-26) revendications 1-12 ---	1-13, 16-18
P, X	WO 01 79446 A (GOODRICH RYLE ; HYSEQ INC (US); WANG DUNRUI (US); WEHRMAN TOM (US);) 25 octobre 2001 (2001-10-25) revendications 11-14 -----	1-18

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets)	Date de publication
<p>RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets</p>				
				Dem. internationale No PCT/FR 02/03041
WO 0037491	A	29-06-2000	AU 1675900 A EP 1144444 A2 WO 0037491 A2 JP 2002539767 T US 6455280 B1 AU 5559400 A AU 5838200 A AU 5838300 A EP 1200576 A2 WO 0100806 A2 WO 0100661 A2 WO 0100803 A2	12-07-2000 17-10-2001 29-06-2000 26-11-2002 24-09-2002 31-01-2001 31-01-2001 31-01-2001 02-05-2002 04-01-2001 04-01-2001 04-01-2001
WO 0100803	A	04-01-2001	AU 1675900 A AU 5838300 A EP 1144444 A2 WO 0100803 A2 JP 2002539767 T US 6455280 B1 AU 5559400 A AU 5838200 A EP 1200576 A2 WO 0100806 A2 WO 0100661 A2 WO 0037491 A2	12-07-2000 31-01-2001 17-10-2001 04-01-2001 26-11-2002 24-09-2002 31-01-2001 31-01-2001 02-05-2002 04-01-2001 04-01-2001 29-06-2000
WO 0003013	A	20-01-2000	EP 0976824 A1 AU 4910299 A WO 0003013 A2	02-02-2000 01-02-2000 20-01-2000
WO 0153486	A	26-07-2001	AU 1748200 A AU 1749900 A AU 2192800 A AU 2224800 A AU 2399300 A AU 2495200 A AU 2596700 A AU 2600800 A AU 2879400 A AU 2883600 A AU 3072199 A AU 3107700 A AU 3381600 A AU 3514400 A CA 2321677 A1 CA 2361840 A1 CA 2361849 A1 CA 2362427 A1 EP 1173563 A1 EP 1263948 A2 EP 1159419 A1 EP 1220905 A2 EP 1135485 A2 EP 1141284 A2 EP 1159422 A1 EP 1141289 A2 US 2002182673 A1 US 2002192209 A1	19-06-2000 12-07-2000 12-07-2000 28-09-2000 28-09-2000 28-09-2000 28-09-2000 28-09-2000 31-07-2001 28-09-2000 27-09-1999 28-09-2000 28-09-2000 28-09-2000 16-09-1999 14-09-2000 14-09-2000 14-09-2000 23-01-2002 11-12-2002 05-12-2001 10-07-2002 26-09-2001 10-10-2001 05-12-2001 10-10-2001 05-12-2002 19-12-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
 renseignements relatifs aux numéros de familles de brevets

 Dem. internationale No
 PCT/FR 02/03041

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication		
WO 0153486 A		US 2002119130 A1	29-08-2002		
		WO 0053753 A2	14-09-2000		
		WO 0053754 A1	14-09-2000		
		WO 0053755 A2	14-09-2000		
		WO 0153486 A1	26-07-2001		
		WO 0053756 A2	14-09-2000		
		WO 0053757 A2	14-09-2000		
		WO 0053758 A2	14-09-2000		
		US 2003004311 A1	02-01-2003		
		US 2002127584 A1	12-09-2002		
		US 2002094416 A1	18-07-2002		
		US 2003009012 A1	09-01-2003		
		US 2003009013 A1	09-01-2003		
		US 2003027992 A1	06-02-2003		
		US 2002183493 A1	05-12-2002		
		US 2003027993 A1	06-02-2003		
		US 2003027212 A1	06-02-2003		
		US 2002183505 A1	05-12-2002		
		WO 0179446 A	25-10-2001	AU 5362001 A	30-10-2001
				EP 1276754 A2	22-01-2003
				WO 0179446 A2	25-10-2001
US 2002142953 A1	03-10-2002				
AU 2728401 A	31-07-2001				
AU 2734401 A	31-07-2001				
AU 3265701 A	31-07-2001				
EP 1242443 A1	25-09-2002				
EP 1250346 A2	23-10-2002				
WO 0153312 A1	26-07-2001				
WO 0153453 A2	26-07-2001				
WO 0153454 A2	26-07-2001				
US 2002197679 A1	26-12-2002				
US 2002146692 A1	10-10-2002				
AU 3298901 A	07-08-2001				
AU 3304101 A	07-08-2001				
WO 0155442 A2	02-08-2001				
WO 0154477 A2	02-08-2001				
AU 6300501 A	26-11-2001				
EP 1282635 A1	12-02-2003				
WO 0187917 A1	22-11-2001				
WO 02059260 A2	01-08-2002				

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/92	G 0 1 N 33/53	D
// C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/92	C
	C 1 2 P 21/08	

(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,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,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,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 マジド,ズーヘル

フランス国、エフ - 5 9 7 0 0 マルク・アン・バレール、リュ・デ・クリザンテム 8 9

Fターム(参考) 2G045 AA13 CA26 DA36 DA66 DA70 FB03
 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
 4C085 AA08 AA13 AA14 BB11 DD22 DD88 EE01 EE05
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA21 BA42 CA40 DA76 DA86 EA20 EA50
 FA34 FA58 FA59 FA60 FA61

专利名称(译)	用于AA4RP测定的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2005502711A	公开(公告)日	2005-01-27
申请号	JP2003527428	申请日	2002-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	Jenfi		
申请(专利权)人(译)	Jenfi		
[标]发明人	ナジブジャミラ マジドズーヘル		
发明人	ナジブ,ジャミラ マジド,ズーヘル		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P3/06 C07K14/47 C07K14/775 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/92		
CPC分类号	A61P3/06 C07K14/47 G01N33/92 G01N2333/775 G01N2500/00		
FI分类号	C07K14/775.ZNA A61K39/395.D A61K39/395.N A61P3/06 C07K16/18 G01N33/53.D G01N33/92.C C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/DA66 2G045/DA70 2G045/FB03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA08 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD22 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/EE05 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA21 4H045/BA42 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA34 4H045/FA58 4H045/FA59 4H045/FA60 4H045/FA61		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	2001011598 2001-09-07 FR 2002010205 2002-08-12 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于测定或检测样品中“载脂蛋白AIV相关蛋白”(AA4RP)的组合物和方法。特别地,本发明涉及一种允许直接测量生物样品中的AA4RP的方法。本发明还涉及AA4RP的合成产物,相应的抗体和包含它们的试剂盒,及其在检测,定量样品中AA4RP,或定量样品中致动脉粥样硬化和非动脉粥样硬化脂质颗粒中的用途。

