

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-504327

(P2004-504327A)

(43) 公表日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int.Cl.⁷

C07K 14/775

GO1N 33/53

GO1N 33/564

F I

C07K 14/775 ZNA

GO1N 33/53 W

GO1N 33/564 Z

テーマコード(参考)

4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2002-512214 (P2002-512214)	(71) 出願人	503028075
(86) (22) 出願日	平成13年7月18日 (2001.7.18)		アーク・セラピューティックス・オサケユキテュア
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月20日 (2003.1.20)		ARK THERAPEUTICS Oy
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/003212		フィンランド、エフイーエン-70210
(87) 国際公開番号	W02002/006314		クオピオ、ネウラニエメンティエ2番、エル9
(87) 国際公開日	平成14年1月24日 (2002.1.24)	(74) 代理人	100062144
(31) 優先権主張番号	0017641.2		弁理士 青山 稜
(32) 優先日	平成12年7月18日 (2000.7.18)	(74) 代理人	100086405
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		弁理士 河宮 治
		(74) 代理人	100068526
			弁理士 田村 恭生
		(74) 代理人	100087114
			弁理士 齋藤 みの里

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心血管疾患に関するペプチドおよびそのアッセイにおけるそれらの使用

(57) 【要約】

環化型または多量体形態の、酸化低密度リポタンパク質に対する親和性を有するペプチドは、冠状動脈性心臓疾患のマーカーである oxLDL を検出するための免疫吸着 (immunosorbent) アッセイに有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

酸化低密度リポ蛋白に対する親和性を有する、環化型または多量体形のペプチド。

【請求項 2】

その単量体形が 8 ~ 40 アミノ酸残基を含有する、請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 3】

同じ長さの apoB - 100 タンパク質の配列と少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含有する、請求項 1 または 2 に記載のペプチド。

【請求項 4】

apoB - 100 タンパク質の少なくとも一部に対応するアミノ酸配列を有する、請求項 3 に記載のペプチド。 10

【請求項 5】

単量体形のペプチドが 10^5 l / mol より大きい親和定数を有する抗体と相互作用する、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 6】

単量体形のペプチドが配列番号 1 ~ 3 のいずれかの配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 7】

単量体形のペプチドが配列番号 5 の配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のペプチド。 20

【請求項 8】

各単量体が 1 つ以上の Lys 残基を含有し、多量体形はジアルデヒドを用いて誘導体化させることにより得ることができる、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 9】

ジアルデヒドがマロンジアルデヒドである、請求項 8 に記載のペプチド。

【請求項 10】

単量体が Cys 残基を含有し、それにより多量体形が連結されている、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 11】

環化型である、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のペプチド。 30

【請求項 12】

イムノアッセイにおいて、酸化低密度リポ蛋白に対する親和性を有するサンプル中の抗体の存在、場合により量を検出するための、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載のペプチドの使用。

【請求項 13】

サンプル中の低密度リポ蛋白に対する自己抗体の量を測定する方法であって、
 (i) サンプルを、固定化した請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載のペプチドと、自己抗体が該ペプチドと結合し得る条件下で接触させること、および
 (i i) 結合の量を決定すること、
 を含む方法。 40

【請求項 14】

サンプルが患者からの血清または血漿サンプルである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

(i) 請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載のペプチド、および
 (i i) 免疫吸着アッセイを行うために必須の試薬
 をそれぞれ含む容器を備えたユニットを有する、酸化 LDL の自己抗体を測定するのに適したキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、冠状動脈性心臓病および他の心血管疾患の危険性を評価するためのアッセイでの使用のためのペプチドの製造に関する。

【0002】

発明の背景

冠状動脈性心臓病(CHD)は欧州の国において主要な死亡原因である。ほとんどの場合、CHDの基本的な原因はアテローム性動脈硬化症である。現在、アテローム性動脈硬化症の危険性は、総コレステロール、低密度リポ蛋白(LDL)および高密度リポ蛋白(HDL)の量を測定することにより評価される。しかし、これらの試験では、およそ1/3の患者の疾患は推測できない。Yla-Herttuala, Current Opinion Lipidol. (1998) 9: 337~344を参照。それゆえ、CHDの危険性を推定するためのよりよいアッセイを開発する必要性がある。

10

【0003】

酸化低密度リポ蛋白(oxLDL)はアテローム性動脈硬化症における危険因子であることが示されているが、循環中での半減期が短いので血漿中のoxLDLを直接測定することは可能ではなかった。それゆえ、最近の研究はLDL酸化の程度を規定するために別の間接測定に焦点をあてている。

【0004】

oxLDLはアテローム性動脈硬化症に重要な役割を果たす。それはアテローム性動脈硬化症の病変に見出されており、種々の細胞型に対し細胞傷害性であり、かつ血中単球に対して走化性である。さらに、oxLDLは免疫原性であり、アテローム性動脈硬化症の病変はoxLDLを認識するイムノグロブリンを含有している(oxLDLに対する自己抗体はヒトおよびウサギ血清中に存在する)。Yla-Herttuala(前述)により示唆されるように、oxLDLを分析するための最も良い方法はoxLDLに対する自己抗体の測定であろう。

20

【0005】

アポリポ蛋白B-100(apoB-100)はLDLにおける主要なタンパク質構成要素である。ヒトcDNAおよびアミノ酸配列は、Chenら、J. Biol. Chem. (1986) 261: 12912~12921により報告されている。

【0006】

LDLの酸化の間、粒子のタンパク質および脂質部分の両方が修飾され得る。Esterbauerら、Free Radical Biol. Med. (1992) 13: 341~390により報告されているように、マロンジアルデヒド(MDA)および4-ヒドロキシノネナル(hydroxynonenal)(4-HNE)はLDL酸化の間に形成される主要な反応性アルデヒドであり、これらは各々、apo-B100のリジン残基とさらに反応し得る。これらのほとんど特徴付けられていない酸化特異的エピトープは自己抗体により認識される。さらに最近、Palinskiら(J. Clin. Invest. (1996) 98: 800-814)により、酸化されたリン脂質が自己抗体に関するエピトープであると示唆されている。さらに、健常な個体が、oxLDLの主要な構成成分であるリソフォスファチジルコリンに対する抗体を生じることが報告されている。

30

【0007】

抗oxLDL自己抗体からは頸動脈アテローム性動脈硬化症、冠動脈アテローム性動脈硬化症および心筋梗塞の進行を推定することができる。また、増加したレベルの自己抗体は、全身性ループスエリトマトーデス(SLE)、子癇前症、慢性大動脈周囲炎、インシュリン非依存性糖尿病および内皮機能不全において見出されている。

40

【0008】

oxLDLに対する自己抗体は、非常に異なるイムノアッセイ(EIAまたはRIA)を使用して測定されてきたが、アッセイの標準化に利用可能な標準方法または参照物質は存在しない。これまでの試験に用いられていたLDLはヒト血漿から精製されており、通常、銅イオンとのインキュベーションまたはMDAとの結合により酸化される。銅酸化型LDLは、酸化特異的エピトープの混合物を含有しているので、均一な抗原を作製するため

50

に酸化プロセスを注意深く標準化しなければならない。ヒト血漿LDLベースの抗原もまた、本質的に不安定であり、市販の試験キットの作製には適していない。それゆえ、標準化することができ、安定で、再現性のある結果を与える試薬を利用する、CHDに関するアッセイを作製する必要性がある。

【0009】

発明の要旨

本発明は、適切なペプチド（例えば、反応性アルデヒドで修飾したもの）が安定であり、かつCHDに関するイムノアッセイにおいて抗原として使用され得る、という認識に基づく。より具体的には、新規なペプチドは、環化形または多量体形の、酸化低密度リポ蛋白に対して親和性を有する。

10

【0010】

本発明の局面の1つに従って、本発明のペプチドはサンプル中の、酸化低密度リポ蛋白に対する親和性を有する抗体の存在および、場合により、量を測定するためのイムノアッセイに使用される。

【0011】

第2の局面に従い、サンプル中の酸化低密度に対する自己抗体の量を測定する方法は、
(i) サンプルを、固定された、上記のように誘導体化されたペプチドと自己抗体がペプチドに結合することを可能とする条件下で、接触させること、および
(ii) 結合の量を検出すること、を含む。

20

【0012】

結合の量は、直接的に測定され得、サンプル中の酸化LDLの量に相関する。抗体の量は酸化LDLとネイティブなLDLとの間の抗体結合の比として表現される。

【0013】

誘導体型ペプチドを使用することにより、イムノアッセイに再現性のある結果を提供する安定な抗原の使用を確実にすることができる。

【0014】

第3の局面に従って、酸化LDLの自己抗体を測定するためのキットは、
(i) 上記の誘導体ペプチドを含む組成物、
(ii) 免疫吸着アッセイを行うために必須の試薬、
を含むマルチコンテナユニット（複数容器からなるユニット）を有する。

30

【0015】

本発明は、タンパク質を患者の血液から単離する必要性が無い、簡単に合成し得る試薬を提供する。このペプチドは、従来のCHDアッセイに用いるタンパク質に伴う短い半減期を有しておらず、それゆえ、診断キット中での使用のために商業的に製造することができる。

【0016】

発明の説明

本発明は、好ましくはapoB-100タンパク質に由来するペプチド、または好ましくはapoB-100タンパク質上のエピトープの構造に類似の構造を形成するアミノ酸配列を有するペプチドの生産に基く。従って、これらのペプチドは酸化LDLに対して親和性を有する自己抗体との特異的な相互作用を受け得る。用語「特異的な相互作用」とは、ペプチド（抗原）に対する自己抗体の認識を意味する。このペプチドは、 10^5 l/mol、好ましくは 10^7 l/mol、より好ましくは 10^8 l/molよりも高い親和定数を有する抗体結合を誘発し得る。

40

【0017】

原則として、およそ10アミノ酸よりも大きい（ただし、自己抗体に対するリガンドとして働く）ペプチド配列が本発明に使用され得る。ペプチドはapoB-100の天然の供給源に由来するか、またはapoB-100に関する既知のタンパク質配列に基づく合成ペプチドであり得る。apoB-100由来のペプチドを単離する方法、ペプチドを合成する方法は当業者に明らかである。

50

【0018】

ペプチドは任意の適切なアミノ酸上で、反応性アルデヒドを用いて誘導体化される。好ましくは、ペプチドはアルギニン、ヒスチジンまたはリジン残基上で誘導体化される。また、ペプチドを誘導体化する方法は、本明細書中に開示される方法に加えて、当業者に明らかである。

【0019】

ペプチドを誘導体化するために用いる反応性アルデヒドは、マロンジアルデヒドまたはヒドロキシノネナルである。また、他の反応性アルデヒドも当業者に明らかである。

【0020】

ペプチドのサイズは自己抗体による認識に十分なものである。好ましくは、ペプチドは10～40アミノ酸のサイズであり、より好ましくは15～30アミノ酸である。好ましくは、ペプチドのアミノ酸配列は、ネイティブなapoB-100タンパク質上の領域と、80%より高い、好ましくは90%より高い、最も好ましくは95%よりも高い同一性を有する。

【0021】

本発明のペプチドは、抗体反応を誘発し得る他の試薬と共に診断アッセイで使用することができる。例えば、ホスファチジルエタノールアミンはMDAを用いて誘導体化することができ、本発明のペプチドと共に使用する場合、自己抗体に対するエピトープとして機能し得る。

【0022】

新規のペプチドベースのEIAアッセイは、心血管疾患およびいくつかの他の障害（例えば、大動脈周囲炎、子癇前症、インシュリン非依存性糖尿病および内皮機能不全）を有する患者の評価および追跡のための試験キットとして使用され得る。

【0023】

イムノアッセイで使用する場合、続いての洗浄工程を簡単に行うことができるように、ペプチドは固体支持体上に固定されていることが好ましい。イムノアッセイを行う方法は当業者に明らかである。

【0024】

以下の実施例は本発明を例示する。

【0025】

実施例1

apoB-100のアミノ酸配列（Chenら、前述）由来の、種々のネイティブなペプチドおよび修飾型ペプチドを、EIAでの使用に適した抗原として試験した。ペプチドをMDAを用いて修飾してoxLDLにおける場合に類似する酸化特異的エピトープを作製した。ペプチドEIAの結果をoxLDL EIA（これは銅酸化型LDLを用いて抗原として最適化されている。Narvanenら、Free Radical Biology & Medicine、印刷中を参照のこと）の結果と比較する。

【0026】

ペプチドを固相ペプチド合成技術およびFmoc化学を用いることにより合成し、C₁₈カラムを用いるHPLCで精製した。合成したペプチドの分子量を、MALDI-TOF質量分析機を用いることにより同定した。apoB-100のアミノ酸配列に由来する、または無関係のいずれかのペプチド配列を、表1に示す。

【0027】

【表1】

表 1. 合成ペプチドの配列

ペプチド	配列	アミノ酸の数	リジン (=K) の数
p62 配列番号 1	DIVAHLLSSSSSVIDALQYKLEGTTTRLTRKRGLK	35	3
p63 配列番号 2	LSVKAQYKKNKHRHSITNPL	20	4
p64 配列番号 3	STTVMNPYMKLAPGELTIIL	20	1
p65 配列番号 4	KKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKK	35	35

10

【0028】

MDAを用いるペプチドの修飾

MDAは、Palinskiら (Arteriosclerosis (1990) 10: 325-335) の修飾方法を用いることによりリジンの第1アミンを介してペプチドに連結した。MDAは、マロンジアルデヒド-ビス(ジメチルアセタール)から、酸加水分解により新規に作製した。次いで、混合物を37℃で3時間攪拌することにより、MDA (10 mol) をペプチド (1 mol) へと連結した。連結効率は第1アミンの存在を示すニンヒドリン反応により検査した。

20

【0029】

ペプチドEIA試験のための血清および血漿サンプルを、実施中の研究から集めた。これは冠状動脈性心臓病が疑われる患者、および健常者対照からのサンプルを含む。これらのサンプルは-20℃で、アリコートで保存した。

【0030】

ペプチドおよびペプチド-MDA複合体に対する自己抗体(ペプチドEIA)

ネイティブなペプチドおよびMDA-修飾型ペプチドは、常にサンプルプレート上で試験した。プレートの1/2をネイティブなペプチド(20 μg/ml)でコーティングし、他方の1/2をMDA修飾型ペプチド(20 μg/ml)でコーティングした[重炭酸塩緩衝液(100 mmol/l、pH 9.5)中100 μl/ウェル]。コーティングしたプレートを室温(RT)で一晩インキュベートし、次いで、0.05% Tween 20を含むリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)を用いて自動洗浄機(Wellwash 4 MK II、Lab systems Oy)で3回洗浄した。プレートを、1%ヒト血清アルブミン(HSA)を含有するPBS(150 μl/ウェル)を用いて室温で1時間ブロックし、上記のように洗浄した。0.2% HSAおよび0.05% Tween 20を含有するPBS中で血清サンプルを希釈(1:20)し、100 μl/ウェルにピペティングした。プレートを室温で2時間インキュベートし、上記のように洗浄した。HRP結合型抗ヒトIgG(サンプル緩衝液中で1:20000に希釈)を各ウェルに加え(100 μl)、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、ペルオキシダーゼ基質(発色源としてテトラメチルベンジジン(TMB)、100 μl/ウェル)を添加し、プレートを暗所にて室温で30分間インキュベートすることにより発色した。0.5 mol/l H₂SO₄(100 μl/ウェル)を用いて反応を停止させ、450 nmで吸光度を測定した(Multiskanマイクロプレートリーダー、Lab systems Oy)。結果を表2に示す。この結果は、ブランク対照を差し引いた後の、ネイティブなペプチドおよび修飾型ペプチドについて得られた吸光度測定値、またはネイティブなペプチドおよび修飾型ペプチドに対する抗体結合の比として表されている。

30

40

【0031】

【表2】

50

表 2 : 自己抗体の反応性

A. 健常者コントロール (n=17).

	OxLDL EIA		PEPTIDE EIA
oxLDL:natLDL 比	1.886 ± 0.689	MDAp63:natp63 比	2.592 ± 0.751
oxLDL	0.591 ± 0.221	MDAp63	0.497 ± 0.184
natLDL	0.351 ± 0.172	natp63	0.216 ± 0.142

10

B. 患者 (n=19).

	OxLDL EIA		PEPTIDE EIA
oxLDL:natLDL 比	2.535 ± 1.430	MDAp63:natp63 比	2.866 ± 0.924
oxLDL	0.600 ± 0.287	MDAp63	0.418 ± 0.141
natLDL	0.258 ± 0.170	natp63	0.159 ± 0.079

【 0 0 3 2 】

比の値に基づくと、ペプチド E I A およびヒト LDL ベースの oxLDL E I A を用いて試験した場合は、抗体の量は対照の場合よりも患者サンプルの場合の方が高かった。ネイティブおよび修飾型 (ペプチド) 抗原を用いる自己抗体の反応は、oxLDL - E I A およびペプチド - E I A の場合は類似している。なぜならば、修飾型抗原 (oxLDL および MDA p 6 3) はネイティブな抗原 (natLDL および natp63) よりもより良く認識されるからである (すなわち、修飾型抗原に対する特異性のほうが高い)。ペプチド - E I A に関する結果は、oxLDL - E I A に関する結果よりも有意に良好である。

20

【 0 0 3 3 】

ペプチド - MDA 複合体を抗原として使用する場合、自己抗体が、ペプチド、MDA、または両方と反応するかどうかを調べるために、マイクロタイタープレートを用いて natp63、MDA および MDA p 6 3 抗原を用いてコーティングし、免疫アッセイを行った。MDA 抗原は、ペプチドを用いずに MDA p 6 3 抗原と同様に製造し、MDA を MDA p 6 3 と同様にコーティングのために希釈した。自己抗体の MDA p 6 3 との反応は、対照中の natp63 および MDA との反応よりも高かった (それぞれ、 0.533 ± 0.077 、 0.282 ± 0.100 および 0.300 ± 0.019 、平均値 \pm SD、 $n = 23$ 、患者サンプルの場合、それぞれ、 0.431 ± 0.040 、 0.222 ± 0.041 および 0.338 ± 0.000 、 $n = 16$)。この結果は、最適な認識にペプチドおよび MDA の両方が必要であることを示している。

30

【 0 0 3 4 】

natp63、MDA および MDA p 6 3 に対する抗体間のスピアマンの相関係数を計算した。対照および患者サンプルの場合、抗 MDA および抗 MDA p 6 3 抗体は相関した (それぞれ、 $r = 0.581$ 、 $p = 0.004$ および $r = 0.582$ 、 $p = 0.018$) が、抗 natp63 および抗 MDA 抗体は相関しなかった (それぞれ、 $r = 0.297$ 、 $p = 0.169$ および $r = 0.112$ 、 $p = 0.68$)。これは、異なる抗体が MDA および natp63 と反応することを示し、ペプチド - MDA 複合体が最適抗原であることの証拠である。

40

【 0 0 3 5 】

実施例 2

何が E I A に対するペプチドの最も良い修飾であるかを見出すために、6 個の異なる形態のペプチド p 6 3 を試験した。

線状 p 6 3 (p 6 3)

50

M D A で修飾した p 6 3 (p 6 3 - M D A)

M D A およびホスファチジルエタノールアミンを用いて修飾した p 6 3 (p 6 3 - P E A - M D A)

ペプチドの両端に 2 個の余分なアミノ酸 (グリシンおよびシステイン) を含有する線状形態の p 6 3 (p 2 4 4) ; 配列番号 5 を参照のこと。

環状 p 2 4 4 (p 2 4 4 c y c)

M D A で修飾した環状 p 6 3 (p 2 4 4 c y c - M D A)

【 0 0 3 6 】

線状ペプチド p 2 4 4 を抗原として用いた場合に、患者サンプルにおける自己抗体の量が最も高かった (表 3) 。また、環状ペプチド (p 2 4 4 c y c) に対する抗体力価は p 6 3 - M D A に対する抗体力価よりもわずかに高かった。この実験において、自己抗体は、ペプチド有り、脂質無しの場合に最も良く反応した。 10

【 0 0 3 7 】

特異性研究

異なる抗原の特異性をペプチドの力価測定により試験した。図 1 は、1 つの患者サンプルを用いて試験した 4 個のペプチド抗原に対する力価曲線を示す。さらに、環状ペプチドおよび線状ペプチド (p 2 4 4 c y c および p 2 4 4) に対する抗体の特異性を、0 . 5 M 塩化ナトリウムをサンプル希釈物に加えることにより試験した。塩をサンプル希釈物に加えた場合、p 2 4 4 、 p 2 4 4 c y c および p 6 3 - M D A に対する患者サンプルの力価は、それぞれ、1 9 % 、 3 8 % および 4 7 % 低かった (2 0 個の患者サンプルの平均値) 20

【 0 0 3 8 】

阻害研究

漸増濃度のペプチドをサンプル希釈物に加えることにより、環状ペプチド (p 2 4 4 c y c) および対応する線状ペプチド (p 2 4 4) の特異性を阻害試験で試験した。p 2 4 4 c y c ペプチドは最も高いインヒビター濃度 (1 0 0 μ g / m l) で阻害し、8 個の患者サンプルの結合の平均は 6 1 % であった (図 2 A) 。3 個のサンプルは 5 0 % 未満で阻害された。p 2 4 4 は最も高いインヒビター濃度 (1 0 0 μ g / m l) で阻害し、2 4 個の患者サンプルの結合の平均は 7 0 % であった (図 2 B) 。3 個のサンプルは 5 0 % 未満で阻害された。p 2 4 4 はおそらく p 2 4 4 c y c ペプチドよりも特異的であるようである 30

最終的に、プレートを p 2 4 4 でコーティングし、患者サンプルの p 6 3 との結合を阻害することにより、p 2 4 4 のエピトープは p 6 3 に類似することが確認された。p 6 3 は最も高い阻害濃度 (1 0 0 μ g / m l) で阻害し、2 2 個の患者サンプルの結合の平均は 5 3 % であった (図 3) 。9 個のサンプルは 5 0 % 未満で阻害した。

【 0 0 3 9 】

p 2 4 4 の修飾

これまでの結果をまとめると、患者サンプルはペプチド 2 4 4 により最も良く認識されるようである。それゆえ、修飾型 p 2 4 4 を M D A を用いて修飾し、p 2 4 4 および p 2 4 4 - M D A の両方を E I A における抗原として使用した。p 2 4 4 および p 2 4 4 - M D A に対する患者サンプルの力価 (平均値 ± S D) は対照サンプルの力価よりもわずかに高 40

【 0 0 4 0 】

ペプチド E I A の評価

C H D の症状を有する患者の 2 0 5 個のサンプルを分析した。患者を血管造影法により試験し、0 - 、1 - 、2 - または 3 - 脈管疾患として分類した。ペプチド p 2 4 4 および p 2 4 4 - M D A をペプチド E I A における抗原として使用し、結果をヒト - L D L - ベースの o x L D L E I A と比較した。

【 0 0 4 1 】

p 2 4 4 - M D A に対する自己抗体の力価は、3 - 脈管疾患を有する患者において、0 - 、1 - または 2 - 脈管疾患を有する患者と比較して最も高かった (A N O V A p = 0 . 50

0.268)。ヒト-LDL-ベースのoxLDL (n=185) に対する自己抗体の力価は、p244に対する力価と相関し (r=0.227 p=0.0019)、ならびに p244-MDA に対する力価と相関していた (p=0.217 p=0.003)。ペプチド p244 および p244-MDA に対する自己抗体の力価を、抗oxLDL 力価に基づいて4つのグループに分類したヒト-LDL-ベースのoxLDL に対する自己抗体の力価と比較した場合に相関が確認された (第1四分位値 .0.072 - 0.22 (n=37)、第2四分位値 .0.22 - 0.36 (n=44)、第3四分位値 .0.36 - 0.63 (n=57) および第4四分位値 .0.63 - 2.757 (n=68)) (図4)。さらに、本発明者らは p244 および p244-MDA に対する抗体の量を、the New York Heart Association (NYHA) 心疾患分類 (heart disease classification) に従って分類した狭心症症状と比較した (NYHA-1 n=5、NYHA-2 n=12、NYHA-3 n=27 および NYHA-4 n=14)。本発明者らは、狭心症の症状が強まると抗体力価が上昇することを見出した (図5)。NYHA クラス分けと比較した冠状血管狭窄の総和 (NYHA-1 n=14、NYHA-2 n=26、NYHA-3 n=57 および NYHA-4 n=29) は、冠状動脈性心臓病の進行に伴う、さらに深刻な症状を示した (図6)。この結果は、冠状血管造影法を用いて試験した冠状血管狭窄の総和、ならびに抗体が狭心症症状の重篤さと相関することを示した。

10

【0042】

【表3】

20

表3. 6個の異なる形態の p63 ペプチド抗原に対する自己抗体の量

ペプチド抗原	P63	P63-MDA	P63-PEA-MDA	P244cyc	P244cyc-MDA	P244
患者 (n=20)	0.389 ± 0.353	0.601 ± 0.192	0.406 ± 0.215	0.734 ± 0.520	0.521 ± 0.504	0.995 ± 0.570

値は、ブランクを差し引いた後の平均吸光度 ± SD である。

【0043】

30

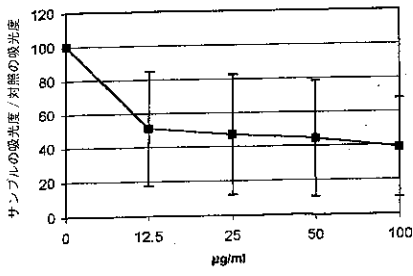
【表4】

表4. p244 および MDA 修飾型 p244 ペプチドに対する自己抗体の量

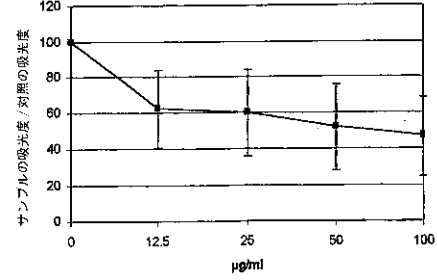
ペプチド抗原	P244	P244-MDA
コントロール (n=23)	0.870 ± 0.371	0.956 ± 0.307
患者 (n=20)	1.074 ± 0.610	1.296 ± 0.544

値は、ブランクを差し引いた後の平均吸光度 ± SD である。

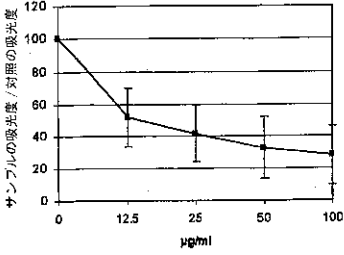
【 図 2 A 】



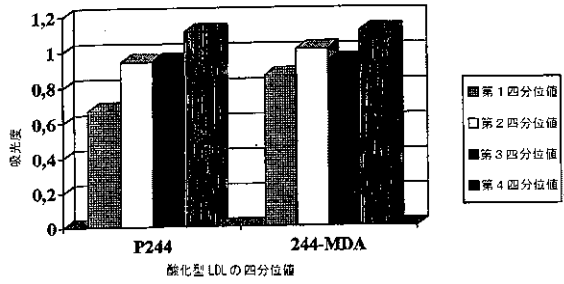
【 図 3 】



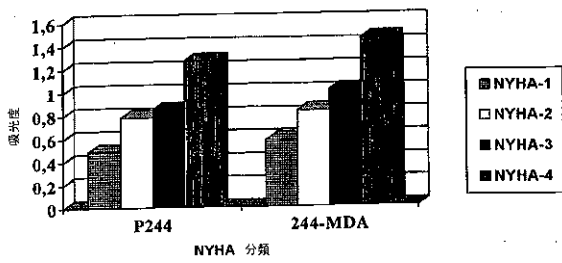
【 図 2 B 】



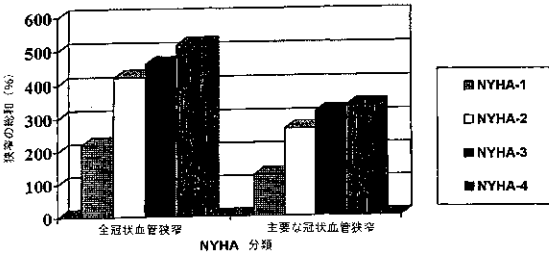
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【国際公開パンフレット】

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

(18) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 January 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/06314 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/00
- (21) International Application Number: PCT/JP01/03212
- (22) International Filing Date: 18 July 2001 (18.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0617641.2 18 July 2000 (18.07.2000) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): ARK THERAPEUTICS LTD. (GB/GB), 6 Warren Mews, London W1T 6AR (GB).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): NARVANEN, Ossi [FI/FI], Ark Therapeutics Oy, Neulantiemäentie 2 L. 9, FIN 70210 Kuopio (FI); YLA-HERTTIALA, Seppo [FI/FI], A.L. Virtanen Institute, University of Kuopio, P.O. Box 1627, FIN-70211 Kuopio (FI).
- (74) Agent: GILL JENNINGS & EVERY, Broadgate House, 7 Broad Street, London EC2M 7LH (GB).
- (81) Designated States (internationally): AP, AG, AT, AM, 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, GU, GT, HK, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regionally): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette



WO 02/06314 A2

(54) Title: PEPTIDES AND THEIR USE IN ASSAYS FOR CARDIOVASCULAR DISEASE

(57) Abstract: A peptide having affinity for oxidised low density lipoprotein, in cyclised or multimeric form is useful in an enzyme immunosolvent assay, to detect oxLDL which is a marker of coronary heart disease.

PEPTIDES AND THEIR USE IN ASSAYS
FOR CARDIOVASCULAR DISEASE

Field of the Invention

5 This invention relates to the preparation of peptides for use in assays for evaluating the risk of coronary heart diseases and other cardiovascular diseases.

Background to the Invention

10 Coronary heart disease (CHD) is the leading cause of death in European countries. In most cases, the basic cause of CHD is atherosclerosis. Currently, the risk of atherosclerosis is evaluated by measuring the amount of total cholesterol, low density lipoprotein (LDL) and high density lipoprotein (HDL). However, these tests do not predict the disease in approximately one third of the patients; see Yla-Herttuala, Current Opinion Lipidol. (1998) 9: 337-344. There is therefore a need to develop a better assay to predict the risk for CHD.

15 Oxidized low density lipoprotein (oxLDL) has been shown to be a risk factor in atherosclerosis, but it has not been possible to measure oxLDL directly in plasma because its half-life in circulation is short. Recent studies have therefore focused on different indirect measurements to define the extent of LDL oxidation.

20 OxLDL plays an important role in atherogenesis. It has been detected in atherosclerotic lesions, is cytotoxic to various cell types and chemotactic for blood monocytes. In addition, oxLDL is immunogenic, and atherosclerotic lesions contain immunoglobulins that recognize oxLDL; autoantibodies against oxLDL are present in human and rabbit sera. The best way to analyze oxLDL appears to be the measurement of autoantibodies against oxLDL, as suggested by Yla-Herttuala, *supra*.

Apolipoprotein B-100 (apoB-100) is the major protein constituent in LDL. The human cDNA and amino-acid sequences are reported by Chen *et al.*, J. Biol. Chem. (1986) 261: 12912-12921.

30 During oxidation of LDL, both the protein and the lipid portion of the particle can be modified. Malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) are the main reactive aldehydes formed during LDL oxidation, as reported

WO 02/06314

PCT/GB01/03212

2

by Esterbauer *et al.*, *Free Radical Biol. Med.* (1992) 13:341-390; each can further react with lysine residues of apoB-100. These poorly characterized oxidation specific epitopes are recognized by the autoantibodies. More recently, it has been suggested by Palinski *et al.*, *J. Clin. Invest.* (1996) 98: 800-814, that oxidized phospholipids are epitopes for autoantibodies. In addition, it has been reported that healthy individuals produce antibodies against lysophosphatidylcholine, which is a major component of oxLDL.

Anti-oxLDL autoantibodies may predict progression of carotid atherosclerosis, coronary atherosclerosis and myocardial infarction. Elevated levels of autoantibodies have also been found in systemic lupus erythematosus (SLE), pre-eclampsia, chronic periaortitis, non-insulin-dependent diabetes mellitus and in endothelial dysfunction.

Autoantibodies against oxLDL have been measured using very different immunoassays (EIA or RIA), and no standard method or reference material is available for the standardization of the assays. LDL used in previous tests has been purified from human plasma and is usually oxidized by incubation with copper ions or by conjugation with MDA. Copper-oxidized LDL contains a mixture of oxidation-specific epitopes, and therefore the oxidation process must be standardized carefully to produce homogeneous antigen. Human plasma LDL-based antigens are also inherently unstable and are not suitable for the production of commercial test kits. Therefore, there is a need to produce an assay for CHD that can be standardised and which makes use of reagents which are stable and give reproducible results.

Summary of the Invention

The present invention is based on the realisation that suitable peptides, e.g. modified with a reactive aldehyde, are stable and can be used as antigens in an immunoassay for CHD. More generally, a novel peptide has affinity for oxidised low density lipoprotein, in cyclised or multimeric form.

According to one aspect of the invention, a peptide of the invention is used in an immunoassay to determine the presence and, optionally, the amount of antibodies, in a sample, having affinity for oxidised low density lipoprotein.

WO 02/06314

PCT/GB01/03212

3

According to a second aspect, a method for measuring the amount of autoantibodies for oxidised low density lipoprotein in a sample, comprises:

(i) contacting the sample with immobilised, derivatised peptides as defined above, under conditions which permit the autoantibodies to bind to the peptides;

5 and

(ii) determining the amount of binding.

The amount of binding can be measured directly and will correlate to the amount of oxidised LDL in a sample. The amount of antibodies can be expressed as the ratio of antibody binding between oxidised LDL and native

10 LDL.

The use of the derivatised peptides ensures that the immunoassay uses a stable antigen which provides reproducible results.

According to a third aspect, a kit for measuring autoantibodies of oxidised LDL, comprises a multicontainer unit having:

(i) a composition comprising derivatised peptides as defined above; and

(ii) reagents necessary to carry out an immunoabsorption assay.

The present invention provides reagents that can be synthesised easily without the need to isolate proteins from a patient's blood. The peptides do not have the short half-life associated with the proteins used in conventional assays for CHD and therefore can be manufactured commercially for use in diagnostic

20 kits.

Description of the Invention

The present invention relies on the production of peptides which are preferably derived from apoB-100 protein, or which preferably have an amino acid sequence which forms a structure similar to that of the epitopes on apoB-100 protein. The peptides are therefore able to undergo specific interaction with autoantibodies which have affinity for oxidised LDL. The term "specific interaction" refers to the recognition of the autoantibodies for the peptide (antigen). The peptides may elicit antibody binding with an affinity constant of

30 greater than 10^5 l/mol, preferably greater than 10^7 l/mol and more preferably greater than 10^8 l/mol.

In principle, any peptide sequence of approximately greater than 10 amino acids may be used in the present invention provided that it acts as a ligand for the autoantibodies. The peptide may be derived from a natural source of apoB-100 or may be a synthetic peptide based on the known protein sequence for apoB-100. Methods to isolate peptides from apoB-100 or to synthesis peptides, will be apparent to the skilled person.

The peptides are derivatised with a reactive aldehyde on any suitable amino acid. Preferably, the peptides are derivatised on an arginine, histidine or lysine residue. Methods for derivatising the peptides, in addition to those disclosed herein, will also be apparent to the skilled person.

The reactive aldehyde used to derivatise the peptides may be malondialdehyde or hydroxynonenal. Others will be apparent to the skilled person.

The size of the peptides is sufficient for recognition by the autoantibodies. Preferably, the peptides are 10-40 amino acids in size, more preferably 15-30 amino acids. The amino acid sequence of the peptides is preferably greater than 80%, preferably greater than 90%, and most preferably greater than 95% identical to a region on the native apoB-100 protein.

The peptides of the present invention may be used in a diagnostic assay together with other reagents capable of eliciting an antibody reaction. For example, phosphatidyl ethanolamine can be derivatised with MDA and, when used with the peptides of the invention, is capable of acting as an epitope for some autoantibodies.

The new peptide-based EIA assay could be used as a test kit for the evaluation and follow-up of patients with cardiovascular diseases and several other disorders, such as periaortitis, pre-eclampsia, non-insulin-dependent diabetes and endothelial dysfunction.

When used in the immunoassay, it is preferable that the peptides are immobilised on a solid support, as this enables subsequent washing steps to be carried out easily. Methods to carry out immunoassays will be apparent to the skilled person.

The following Examples illustrate the invention.

Example 1

Various native and modified peptides, derived from the amino acid sequence of apoB-100 (Chen *et al.*, *supra*), were tested as antigens suitable for use in EIA. The peptides were modified with MDA to produce similar oxidation specific epitopes as in oxLDL. The results of peptide EIA are compared to the results of oxLDL EIA which was optimized using copper-oxidized LDL as antigen; see Närvänen *et al.*, Free Radical Biology & Medicine, in press.

Peptides were synthesized by using solid-phase peptide synthesis technology and Fmoc chemistry and purified with HPLC using a C₁₈ column. The molecular weights of the synthesized peptides were identified by using a MALDI-TOF mass spectrometer. Peptide sequences either derived from or unrelated to the amino acid sequence of apoB-100 are shown in Table 1.

15 Table 1. Sequences of the synthetic peptides

Peptide	Sequence	Number of amino acids	Number of lysines (=K)
p62 SEQ ID NO. 1	DIVAHLLSSSSVIDALQYKLEGTTTLTRKRGLK	35	3
20 p63 SEQ ID NO. 2	LSVKAQYKKNKHRHSITNPL	20	4
p64 SEQ ID NO. 3	STTVMNPYMKLAPGELTIIL	20	1
25 p65 SEQ ID NO. 4	KKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKK	35	35

Modification of the peptide with MDA

MDA was coupled to the peptide via the primary amines of lysines by using a modification of the method of Palinski *et al.*, Arteriosclerosis (1990) 10: 325-335. MDA was made freshly from malondialdehyde-bis(dimethyl acetal) by acid hydrolysis. 10 moles of MDA was then coupled to 1 mole of peptide by stirring the mixture for 3 hours at 37°C. The efficiency of coupling was checked by ninhydrin reaction which reveals the presence of primary amines.

WO 02/06314

PCT/GB01/03212

6

Serum and plasma samples for peptide EIA tests were collected from ongoing studies including samples from patients with suspected coronary heart disease and from healthy controls. These samples were stored in aliquots at -20°C .

5 Autoantibodies against peptides and peptide-MDA complexes (peptide EIA)

Native and MDA-modified peptides were tested always on the same plate. One half of the plate was coated with the native peptide (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and the other half was coated with the MDA-modified peptide [(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ in 100 mmol/l bicarbonate buffer (pH 9.5)]. Coated plates were incubated overnight at room temperature (RT) and then washed with an automatic washer (Wellwash 4 MK II, Labsystems Oy) three times with phosphate buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween 20. Plates were blocked with PBS containing 1% human serum albumin (HSA) (150 $\mu\text{l}/\text{well}$) for 1 h at RT and washed as above. Serum samples were diluted 1:20 in PBS containing 0.2% HSA and 0.05% Tween 20 and pipetted 100 $\mu\text{l}/\text{well}$. Plates were incubated for 2 h at RT and washed as above. HRP-conjugated anti-human IgG (diluted 1:20 000 in the sample buffer) was added (100 μl) to each well and incubated for 1 h at RT. After washing, colour was developed by adding the peroxidase substrate (tetramethylbenzidine (TMB) as a chromagen, 100 $\mu\text{l}/\text{well}$) and incubating the plates for 30 min at room temperature in the dark. The reaction was stopped with 0.5 mol/l H_2SO_4 (100 $\mu\text{l}/\text{well}$) and absorbances were measured at 450 nm (Multiskan microplate reader, Labsystems Oy). The results are shown in Table 2 and are expressed as the absorbance measurement obtained for the native and the modified peptides or as the ratio between antibody binding to the native and the modified peptides after subtracting the blank control.

WO 02/06314

PCT/GB01/03212

7

Table 2: Reactivity of autoantibodies

A. Healthy controls (n=17).

	OxLDL EIA		PEPTIDE EIA
5 oxLDL:natLDL ratio	1.886 ± 0.689	MDAp63:natp63 ratio	2.592 ± 0.751
oxLDL	0.591 ± 0.221	MDAp63	0.497 ± 0.184
natLDL	0.351 ± 0.172	natp63	0.216 ± 0.142

B. Patients (n=19).

	OxLDL EIA		PEPTIDE EIA
10 oxLDL:natLDL ratio	2.535 ± 1.430	MDAp63:natp63 ratio	2.866 ± 0.924
oxLDL	0.600 ± 0.287	MDAp63	0.418 ± 0.141
natLDL	0.258 ± 0.170	natp63	0.159 ± 0.079

15 Based on the ratio values, the amount of autoantibodies was higher in patient samples than in controls when tested with the peptide EIA and the human LDL-based oxLDL EIA. The reactions of autoantibodies using the native and modified (peptide) antigens are similar in oxLDL-EIA and peptide-EIA because the modified antigens (oxLDL and MDAp63) are recognized better than the native antigens (natLDL and natp63), i.e. there is greater specificity for the modified antigens. The results for the peptide-EIA are significantly better than for the oxLDL-EIA.

20 To find out whether autoantibodies react with the peptide, with MDA or both when peptide-MDA complexes are used as antigen, a microtiter plate was coated with natp63, MDA and MDAp63 antigen and the immunoassays performed. MDA antigen was prepared as MDAp63 antigen but without peptide and MDA was diluted for coating in the same way as MDAp63. The reaction of autoantibodies was higher with MDAp63 than with natp63 and MDA, in both control (0.533±0.077, 0.282±0.100 and 0.300±0.019, respectively, mean±SD n=23) and patient samples (0.431±0.040, 0.222±0.041 and 0.338±0.000, respectively, n=16), indicating that both peptide and MDA are needed for optimal recognition.

WO 02/06314

PCT/GB01/03212

8

Spearman correlation coefficients were calculated between antibodies against natp63, MDA and MDAp63. Anti-MDA and anti-MDAp63 antibodies correlated in control and patient samples ($r=0.581$ $p=0.004$ and $r=0.582$ $p=0.018$, respectively), but anti-natp63 and anti-MDA antibodies did not correlate ($r=0.297$ $p=0.169$ and $r=0.112$ $p=0.68$, respectively). This shows that different antibodies react with MDA and natp63 and is evidence that the peptide-MDA complex is the optimal antigen.

Example 2

Six different forms of peptide p63 were tested, to find out what is the best modification of the peptide for EIA:

- linear p63 (p63)
- p63 modified with MDA (p63-MDA)
- p63 modified with MDA and phosphatidylethanolamine (p63-PEA-MDA)
- a linear form of p63, which contains two extra amino acids (glycine and cysteine) at both ends of the peptide (p244); see SEQ ID NO. 5
- cyclic p244 (p244cyc)
- cyclic p63 modified with MDA (p244cyc-MDA)

The amount of autoantibodies was highest in patient samples when the linear peptide p244 was used as antigen (Table 3). Antibody titers against cyclic peptide 244cyc were also slightly higher than against p63-MDA. In this study autoantibodies reacted most with peptides without lipids.

Specificity studies

The specificity of different antigens was tested by titration of peptides. Figure 1 shows titration curves for 4 peptide antigens tested with one patient sample. In addition, the specificity of antibodies against cyclic and linear peptides, p244cyc and p244, was tested by adding 0.5 M sodium chloride to sample diluent. The titer of patient samples against p244, p244cyc and p63-MDA was 19%, 38% and 47% lower (mean of 20 patient samples), respectively, when salt was added to sample diluent. It appears that antibodies against p244 have the best specificity.

Inhibition studies

The specificity of cyclic (p244cyc) and the corresponding linear peptide (p244) were tested in inhibition tests by adding increasing concentrations of peptides to sample diluent. P244cyc peptide inhibited with the highest inhibitor concentration (100 µg/ml), the average being 61% of the binding of 8 patient samples (Fig. 2A); 3 samples were inhibited by less than 50%. P244 inhibited with the highest inhibitor concentration (100 µg/ml), the average being 70% of the binding of 24 patient samples (Fig. 2B). 3 samples were inhibited less than 50%. P244 seemed to be more specific than p244cyc peptide. Finally, it was confirmed that the epitope of p244 is similar to p63 by coating plate with p244 and inhibiting the binding of patient samples with p63. P63 inhibited with the highest inhibitor concentration (100 µg/ml), the average being 53% of the binding of 22 patient samples (Fig. 3). 9 samples were inhibited less than 50%.

Modification of p244

As a summary of previous results it appears that patient samples are best recognized by the peptide p244. Therefore, modified p244 was modified with MDA and p244 and p244-MDA were both used as antigen in EIA. The titers of patient samples (mean ± SD) against p244 and p244-MDA were slightly higher than titers of control samples (Table 5).

Evaluation of peptide EIA

205 samples of patients with symptoms of CHD were analysed. The patients were angiographically tested and classified as 0-, 1-, 2-, or 3-vessel disease. Peptides p244 and p244-MDA were used as antigen in peptide EIA, and the results compared to human-LDL-based oxLDL EIA.

The titers of autoantibodies against p244-MDA were highest in those patients with 3-vessel disease compared to 0-, 1-, or 2-vessel disease (ANOVA $p=0.0268$). The titers of autoantibodies against human-LDL-based oxLDL ($n=185$) correlated with the titers against p244 ($r=0.227$ $p=0.0019$) and with the titers against p244-MDA ($p=0.217$ $p=0.003$). The correlation was confirmed when the titers of autoantibodies against peptides p244 and p244-MDA were compared to the titers of autoantibodies against human-LDL-based oxLDL classified to four groups based on anti-oxLDL titer (1. quartile 0.072-0.22 ($n=37$),

WO 02/06314

PCT/GB01/03212

10

2. quartile 0.22-0.36 (n=44), 3. quartile 0.36-0.63 (n=57), and 4. quartile 0.63-2.757 (n=68)) (Fig. 4). In addition, we compared the amount of antibodies against p244 and p244-MDA to angina pectoris symptoms classified according to the New York Heart Association (NYHA) heart disease classification (NYHA-1 n=5, NYHA-2 n=12, NYHA-3 n=27, and NYHA-4 n=14). We found that antibody titers increased when angina pectoris symptoms increased (Fig. 5). The total sum of coronary stenosis compared with NYHA classification (NYHA-1 n=14, NYHA-2 n=26, NYHA-3 n=57, and NYHA-4 n=29) showed more serious symptoms with the progression of coronary disease (Fig. 6). This result revealed that the total sum of coronary stenosis examined using coronary angiography is correlated as well as the antibodies with the seriousness of angina pectoris symptoms.

Table 3. The amount of autoantibodies against six different forms of p63 peptide antigen

Peptide antigen	P63	P63-MDA	P63-PEA-MDA	P244cyc	P244cyc-MDA	P244
Patients (n=20)	0.389 ± 0.353	0.601 ± 0.192	0.406 ± 0.215	0.734 ± 0.520	0.521 ± 0.504	0.995 ± 0.570

Values are mean absorbances ± SD after subtracting the blank.

Table 4. The amount of autoantibodies against p244 and MDA modified p244 peptide

Peptide antigen	P244	P244-MDA
Controls (n=23)	0.870 ± 0.371	0.956 ± 0.307
Patients (n=20)	1.074 ± 0.610	1.296 ± 0.544

Values are mean absorbances ± SD after subtracting the blank.

WO 02/06314

PCT/GB01/03212

11

CLAIMS

1. A peptide having affinity for oxidised low density lipoprotein, in cyclised or multimeric form.
2. A peptide according to claim 1, of which the monomeric form comprises
5 between 8 and 40 amino acid residues.
3. A peptide according to claim 1 or claim 2, which comprises an amino acid sequence having at least 80% identity to a sequence of the same length in apoB-100 protein.
4. A peptide according to claim 3, which has an amino acid sequence
10 corresponding to part at least of apoB-100 protein.
5. A peptide according to any preceding claim, wherein the monomeric form of the peptide interacts with the antibody with an affinity constant of greater than 10^5 μ mol.
6. A peptide according to any preceding claim, wherein the monomeric form
15 of the peptide comprises any of SEQ ID NOS. 1 to 3.
7. A peptide according to any of claims 1 to 5, wherein the monomeric form of the peptide comprises SEQ ID NO. 5.
8. A peptide according to any preceding claim, wherein each monomer
20 comprises one or more Lys residues and the multimeric form is obtainable by derivatisation with a dialdehyde.
9. A peptide according to claim 8, wherein the dialdehyde is malondialdehyde.
10. A peptide according to any of claims 1 to 7, wherein the monomer contains Cys residues and the multimeric form is linked thereby.
- 25 11. A peptide according to any of claims 1 to 7, which is cyclised.
12. Use of a peptide according to any preceding claim, in an immunoassay to determine the presence and, optionally, the amount of antibodies in a sample, having affinity for oxidised low density lipoprotein.

WO 02/06314

PCT/GB01/03212

12

13. A method for measuring the amount of autoantibodies for oxidised low density lipoprotein in a sample, comprising:
- (i) contacting the sample with an immobilised peptide according any of claims 1 to 11, under conditions which permit the autoantibodies to bind to the peptides; and
 - (ii) determining the amount of binding.
- 5
14. A method according to claim 13, wherein the sample is a serum or plasma sample from a patient.
15. A kit suitable for measuring autoantibodies of oxidised LDL, comprising
- 10 a unit including containers respectively containing:
- (i) a peptide according to any of claims 1 to 11; and
 - (ii) reagents necessary to carry out an immunoadsorbence assay.

Figure 1

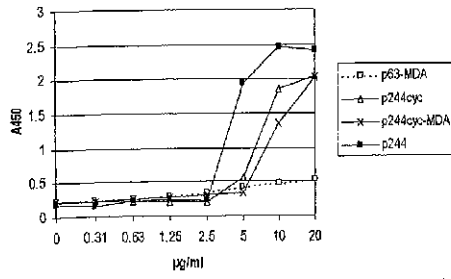


Figure 2A

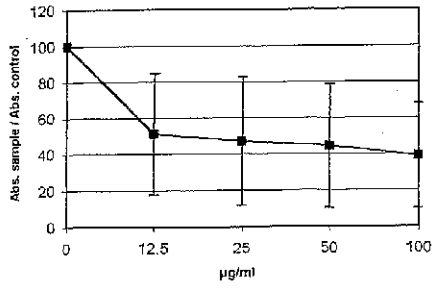


Figure 2B

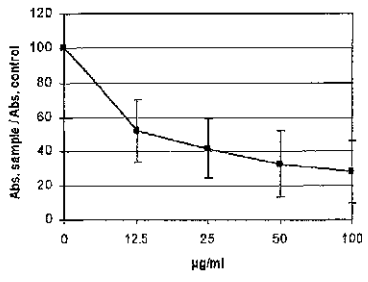


Figure 3

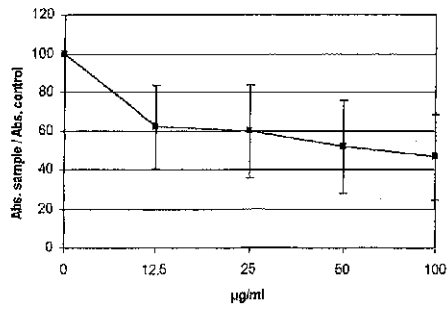
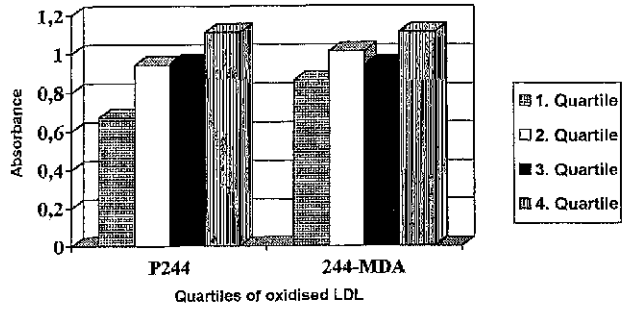


Figure 4

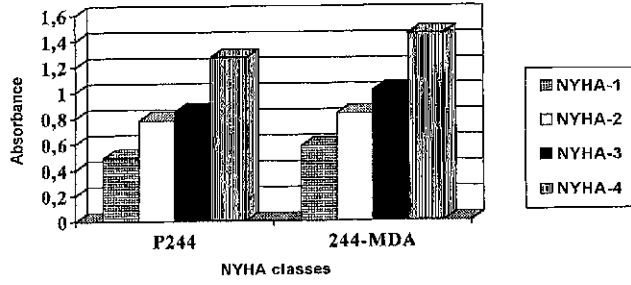


WO 02/06314

PCT/GB01/03212

4/5

Figure 5

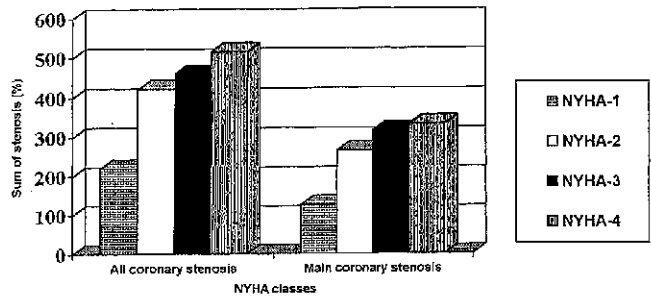


WO 02/06314

PCT/GB01/03212

5/5

Figure 6



WO 02/06314

PCT/GB01/03212

SEQUENCE LISTING

<110> Ark Therapeutics Ltd.

<120> PEPTIDES AND THEIR USE IN ASSAYS FOR CARDIOVASCULAR DISEASE

<130> REP06362WC

<140> not yet known

<141> 2001-07-18

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: oligopeptide

<400> 1

Asp	Ile	Val	Ala	His	Leu	Leu	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Val	Ile	Asp	Ala
1					5					10					15

Leu	Gln	Tyr	Lys	Leu	Glu	Gly	Thr	Thr	Arg	Leu	Thr	Arg	Lys	Arg	Gly
			20					25					30		

Leu Lys

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: oligopeptide

<400> 2

Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Gln	Tyr	Lys	Lys	Asn	Lys	His	Arg	His	Ser	Ile
1				5						10					15

WO 02/06314

PCT/GB01/03212

Thr Asn Pro Leu
20

<210> 3
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: oligopeptide

<400> 3
Ser Thr Thr Val Met Asn Pro Tyr Met Lys Leu Ala Pro Gly Glu Leu
1 5 10 15

Thr Ile Ile Leu
20

<210> 4
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: oligopeptide

<400> 4
Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
20 25 30

Lys Lys Lys
35

<210> 5
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

WO 02/06314

PCT/GB01/03212

<223> Description of Artificial Sequence: oligopeptide

<400> 5

Cys Gly Leu Ser Val Lys Ala Gin Tyr Lys Lys Asn Lys His Arg His
1 5 10 15

Ser Ile Thr Asn Pro Leu Gly Cys
20

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 January 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/06314 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 14/775, G01N 33/92
- (21) International Application Number: PCT/GB01/03212
- (22) International Filing Date: 18 July 2001 (18.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0017641.2 18 July 2000 (18.07.2000) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): ARK THERAPEUTICS Oy (FI/GB); Neulaniementie 2 L9, FIN-70210 Kuopio (FI).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): NARVANEN, Outi (FI/GB); Ark Therapeutics Oy, Neulaniementie 2 L 9, FIN-70210 Kuopio (FI); VLA-HERTTALA, Seppo (FI/GB); A. J. Virmann Institute, University of Kuopio, P O Box 1627, FIN-70211 Kuopio (FI).
- (74) Agents: GILL, JENNINGS & EVERY et al.; Broadgate House, 7 Eldon Street, London EC2M 7LH (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BR, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, GM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, NG, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the international Bureau
- (88) Date of publication of the international search report: 18 April 2002

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



WO 02/06314 A3

(54) Title: PEPTIDES AND THEIR USE IN ASSAYS FOR CARDIOVASCULAR DISEASE

(57) Abstract: A peptide having affinity for oxidised low density lipoprotein, in cyclic or multimeric form is useful in an enzyme immunoassay to detect oxLDL, which is a marker of coronary heart disease.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 01/03212
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 CO/K14/775 G01N33/92		
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 CO/K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation in 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) WPI Data, SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data, EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	WO 98 59248 A (LEUVEN RESEARCH & DEVELOPMENT VZW) 30 December 1998 (1998-12-30) page 1, line 20 - line 29; page 3, line 28 - line 33; page 7, line 17 - line 25; examples 1.4	1-15
X, Y	WO 98 42751 A (UNIVERSITY OF LEICESTER) 1 October 1998 (1998-10-01) the entire document, particularly page 2 - page 3; page 5 - page 6; page 9, SEQ ID Nds 1 and 2: claims 1-4, 19-22	1-15
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in suite		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "F" earlier document but published or entered the international filing date "I" document which may throw doubts on priority status or which is cited to establish the publication date or another status or other special reasons as specified "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
* "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to demonstrate the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
7 February 2002	19/02/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5418, Patentweg 2 NL- 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 51 651 epo NL Fax (+31-70) 340-2040	Authorized officer Schmidt, H	

Form PCT/ISA(21) (app. to Annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/GB 01/03212

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VIITA H ET AL.: "Different apolipoprotein B breakdown patterns in models of oxidized low density lipoprotein" LIFE SCIENCES, vol. 65, no. 8, 1999, pages 783-793, XP001053293 abstract	1-10
Y	---	11-15
A	WO 98 56938 A (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE)) 17 December 1998 (1998-12-17) figure 1 ---	1-15
A	US 5 408 038 A (SMITH ET AL.) 18 April 1995 (1995-04-18) SEQ ID NO 1; column 36, line 12 - line 48 ---	1-15
A	WO 97 43311 A (ROYAL FREE HOSPITAL SCHOOL OF MEDICINE) 20 November 1997 (1997-11-20) SEQ ID NO 12 ---	1-15
A	CHEN PF ET AL.: "Primary sequence mapping of human apolipoprotein B-100 epitopes" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 175, 15 July 1988 (1988-07-15), pages 111-118, XP001053294 page 112, column 2; figure 1; table 1 -----	1-15

3

Form PCT/GB217 (Continuation of Search Report) of 1992

International Application No. PCT/88 01 03212

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-15 (partially)
peptide comprising SEQ ID NO 1 and its use and method
2. Claims: 1-15 (partially)
peptide comprising SEQ ID NO 2 and its use and method
3. Claims: 1-15 (partially)
peptide comprising SEQ ID NO 3 and its use and method
4. Claims: 1-15 (partially)
peptide comprising SEQ ID NO 5 and its use and method

International Application No. PCT/GB 01 03212

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 1-15 (partially)

Present claims 1-15 relate to peptides defined by reference to a desirable characteristic or property, namely their affinity for oxidised low density lipoprotein. The claims cover all peptides having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such peptides. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the peptides by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to peptides in cyclised or multimeric form wherein the monomer comprises SEQ ID Nos 1 to 3 and 5, and fragments of apolipoprotein B-100 having between 8 to 40 amino acid residues (see claim 2).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB 01/03212

Patent document cited in search report	Publication date	Parent family member(s)	Publication date
WO 9859248 A	30-12-1998	AU 3442397 A WO 9859248 A1 EP 1021728 A1	04-01-1999 30-12-1998 26-07-2000
WO 9842751 A	01-10-1998	AU 6736698 A EP 0968230 A1 WO 9842751 A1	20-10-1998 05-01-2000 01-10-1998
WO 9856938 A	17-12-1998	AU 8140198 A WO 9856938 A1	30-12-1998 17-12-1998
US 5408038 A	18-04-1995	WO 9307165 A1 US 5786206 A	15-04-1993 28-07-1998
WO 9743311 A	20-11-1997	EP 0917539 A1 WO 9743311 A1 JP 2000509993 T	26-05-1999 20-11-1997 08-08-2000

Form PCT/ISA/210 (parent family information) July 1992

フロントページの続き

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

(72)発明者 オウティ・ナルヴァネン

フィンランド、エフイーエン - 7 0 2 1 0 クオピオ、ネウラニエメンティエ 2 番、エル 9、アーク・セラピューティックス・オサケユキテュア

(72)発明者 セッポ・ユラ - ヘルツチュアラ

フィンランド、エフイーエン - 7 0 2 1 1 クオピオ、ペー・オー・ボックス 1 6 2 7、ユニヴァーシティ・オブ・クオピオ、アー・イー・ヴィルタネン・インスティテュート

Fターム(参考) 4H045 AA10 BA17 BA18 BA50 CA42 EA50

