

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680040006.5

[51] Int. Cl.

*C07K 16/18 (2006.01)*  
*A61K 39/395 (2006.01)*  
*A61K 39/00 (2006.01)*  
*A61P 9/10 (2006.01)*  
*A61K 31/33 (2006.01)*  
*G01N 33/68 (2006.01)*

[43] 公开日 2008 年 12 月 3 日

[11] 公开号 CN 101316863A

[51] Int. Cl. (续)

*G01N 33/53 (2006.01)*

[22] 申请日 2006.9.4

[21] 申请号 200680040006.5

[30] 优先权

[32] 2005. 9. 2 [33] GB [31] 0517878.5

[86] 国际申请 PCT/EP2006/008594 2006.9.4

[87] 国际公布 WO2007/025781 英 2007.3.8

[85] 进入国家阶段日期 2008.4.25

[71] 申请人 生物发明国际公司

地址 瑞典隆德

[72] 发明人 罗兰·卡尔松 扬·尼尔松

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

代理人 吴小瑛

权利要求书 5 页 说明书 35 页 附图 4 页

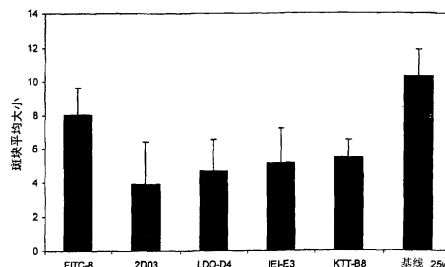
[54] 发明名称

用于诱导动脉粥样硬化斑块消退的免疫治疗

[57] 摘要

抗氧化的 LDL 的免疫治疗用于诱导个体中先前存在的动脉粥样硬化病变的消退的用途。免疫治疗可以是被动的免疫治疗，利用与氧化的 LDL 上存在的表位结合的抗体，或者是主动免疫治疗，利用用于诱导抗氧化的 LDL 上存在的表位的免疫反应的疫苗组合物。

斑块消退



1. 抗氧化的低密度脂蛋白(LDL)的免疫治疗用于诱导个体动脉粥样硬化斑块消退的用途。
2. 根据权利要求1的用途,其中免疫治疗是抗存在于氧化的LDL上而非存在于天然LDL上的表位。
3. 根据权利要求1或2的用途,其中免疫治疗是抗至少一种氧化的ApoB-100表位。
4. 根据权利要求3的用途,其中ApoB-100表位选自表1中列出的肽,或含有在表1中列出的肽的至少6个连续氨基酸残基的片段。
5. 根据权利要求1或2的用途,其中免疫治疗是抗至少一种存在于氧化的LDL上的氧化脂质表位。
6. 诱导需要该方法的个体动脉粥样硬化斑块消退的方法,该方法包含将下述(a)或(b)施用于个体:
  - (a)至少一种抗体,其选择性地与LDL氧化表位结合;
  - (b)至少一种LDL氧化表位。
7. 下述(a)或(b)在制备诱导个体动脉粥样硬化斑块消退的药物中的用途:
  - (a)至少一种抗体,其选择性地与LDL氧化表位结合;
  - (b)至少一种LDL氧化表位。
8. 根据权利要求6或7的方法或用途,其中LDL氧化表位包含ApoB-100的氧化表位。
9. 根据权利要求8的方法或用途,其中ApoB-100的表位选自表1中列出的肽,或含有在表1中列出的肽的至少6个连续氨基酸残基的片段。
10. 根据权利要求6或7的方法或用途,其中LDL氧化表位包含LDL的氧化脂质表位。
11. 根据权利要求6-10的任一项的方法或用途,其中LDL氧化表位包含通过与铜接触或通过丙二醛(MDA)而得以氧化的LDL表位。
12. 根据权利要求6-11的任一项的方法或用途,其中抗体是人源化抗体。

13. 根据权利要求 6—12 的任一项的方法或用途，其中抗体是抗体片段。

14. 根据权利要求 13 的方法或用途，其中抗体片段是单链抗体片段(scFv)。

15. 根据上述权利要求中任一项的方法或用途，其中所述个体是人类个体。

16. 根据权利要求 15 的方法或用途，其中所述的人类个体是患有与动脉粥样硬化相关的心血管疾病或处于患有与动脉粥样硬化相关的心血管疾病风险中的个体。

17. 根据权利要求 16 的方法或用途，其中与动脉粥样硬化相关的心血管疾病选自冠状动脉疾病、心肌梗塞和中风。

18. 根据权利要求 15—17 中任一项的方法或用途，其中所述的人类个体是具有晚期或严重动脉粥样硬化的个体，或具有晚期或严重形式的与动脉粥样硬化相关的心血管疾病的个体。

19. 根据权利要求 6 和 8—18 中任一项的方法或用途，其还包含检测个体动脉粥样硬化斑块的大小和/或数量和/或程度的之前的步骤。

20. 根据权利要求 6 和 8—19 中任一项的方法或用途，其还含检测个体中动脉粥样硬化斑块程度的之后的步骤。

21. 抵抗与动脉粥样硬化相关的心血管疾病的方法，所述方法包括：通过将(a)至少一种抗体分子，所述抗体分子选择性地与 LDL 氧化表位结合，或(b)至少一种 LDL 氧化表位施用于个体，以诱导个体动脉粥样硬化斑块消退；以及将他汀类施用于个体。

22. 下述(a)或(b)在制备用于通过诱导个体动脉粥样硬化斑块消退而抵抗与动脉粥样硬化相关的心血管疾病的药物中的用途，其中所述个体已施用他汀类：

- (a)至少一种抗体分子，所述抗体分子选择性地与 LDL 氧化表位结合；
- (b)至少一种 LDL 氧化表位。

23. 他汀类在制备用于抵抗与动脉粥样硬化相关的心血管疾病的药物中的用途，其中所述个体已施用下述(a)或(b)以诱导动脉粥样硬化斑块消退：

- (a)至少一种抗体分子，所述抗体分子选择性地与 LDL 氧化表位结合；  
(b)至少一种 LDL 氧化表位。

24. 下述(a)或(b)和他汀类在制备用于通过诱导动脉粥样硬化斑块消退而抵抗与动脉粥样硬化相关的心血管疾病的药物中的用途：

- (a)至少一种抗体分子，所述抗体分子选择性地与 LDL 氧化表位结合；  
(b)至少一种 LDL 氧化表位。

25. 药物制剂，其包含：(a)至少一种抗体分子，所述抗体分子选择性地与 LDL 氧化表位结合，或(b)至少一种 LDL 氧化表位，和他汀类，以及药用可接受的佐剂、稀释剂或载体。

26. 试剂盒部分，其包括：

至少一种抗体，所述抗体选择性地与 LDL 氧化表位结合，或(b)至少一种 LDL 氧化表位，和

他汀类，

其中各成分以适合于与其他成分联合施用的形式提供。

27. 根据权利要求 21—26 中任一项的方法或用途或药物制剂或试剂盒部分，其中所述他汀类选自阿托伐他汀、西立伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、美伐他汀、普伐他汀、罗伐他汀和辛伐他汀。

28. 诱导个体动脉粥样硬化斑块消退的抗体的鉴定方法，该方法包括：提供抗体，所述抗体选择性地与 LDL 氧化表位结合，并且

在动脉粥样硬化斑块消退的分析中检验抗体，其中在所述分析中动脉粥样硬化斑块消退表明抗体是诱导动脉粥样硬化斑块消退的抗体。

29. 根据权利要求 28 的方法，其中所述动脉粥样硬化斑块消退的分析是利用动脉粥样硬化动物模型的体内分析。

30. 根据权利要求 28 或 29 的方法，其中所述抗体分离自人抗体片段文库。

31. 根据权利要求 28—30 中任一项的方法，其中所述抗体选择性地与 ApoB-100 的氧化表位结合。

32. 诱导个体动脉粥样硬化斑块消退的试剂的鉴定方法，该方法包括：提供包含 LDL 氧化表位的试剂，

将所述试剂施用于患有动脉粥样硬化斑块的个体，并且

检测试剂是否诱导动脉粥样硬化斑块的消退，  
其中动脉粥样硬化斑块的消退表明试剂是诱导动脉粥样硬化斑块消退的试剂。

33. 根据权利要求 32 的方法，其中检测试剂是否诱导动脉粥样硬化斑块消退包括利用动脉粥样硬化动物模型的体内分析。

34. 根据权利要求 32 的方法，其中检测试剂是否诱导动脉粥样硬化斑块消退包括在患有动脉粥样硬化斑块的人类个体中检验试剂。

35. 根据上述权利要求中任一项的方法或用途或药物制剂或试剂盒部分，其中动脉粥样硬化斑块的消退包括个体的主动脉中动脉粥样硬化斑块面积减少至少 5%。

36. 抗体，其包含：

至少一种互补决定区(CDR)，其具有如表 2 中所示的抗体 2D03 的相应 CDR 的氨基酸序列，或

至少一种 CDR，其具有如表 2 中所示的抗体 LDO D4 的相应 CDR 序列。

37. 根据权利要求 36 所述的抗体，其包含：

3 个轻链 CDR，其具有抗体 2D03 的相应 3 个轻链 CDR 的序列，或

3 个重链 CDR，其具有抗体 2D03 的相应 3 个重链 CDR 的序列，或

3 个轻链 CDR，其具有抗体 LDO D4 的相应 3 个轻链 CDR 的序列，或

3 个重链 CDR，其具有抗体 LDO D4 的相应 3 个重链 CDR 的序列。

38. 根据权利要求 37 所述的抗体，其包含：

3 个轻链 CDR 和 3 个重链 CDR，其具有抗体 2D03 的相应 CDR 的序列，或

3 个轻链 CDR 和 3 个重链 CDR，其具有抗体 LDO D4 的相应 CDR 的序列。

39. 抗体 2D03 或抗体 LDO D4。

40. 抗体，所述抗体选择性地与氧化的 LDL 表位结合，所述氧化的 LDL 表位选择性地与抗体 2D03 或抗体 LDO D4 结合。

41. 药物组合物，其包含权利要求 36—40 中任一项所述的抗体和药用可接受的载体。

42. 根据权利要求 36—40 中任一项所述的抗体，其用于药物中。

43. 权利要求 36—40 中任一项的抗体在制备用于诱导动脉粥样硬化斑块消退的药物中的用途。

## 用于诱导动脉粥样硬化斑块消退的免疫治疗

本发明涉及用于治疗心血管疾病的免疫疗法。

动脉粥样硬化是一种多因子病，尤其在存在生化风险因子(包括吸烟、高血压、糖尿病、高胆固醇血症、高血浆低密度脂蛋白(LDL)和甘油三酯、高纤维蛋白原血症和高血糖等)的人群中发生。动脉粥样硬化是慢性病，其导致大动脉和中动脉的最内层(内膜)增厚。其减少血流量并且导致通过受影响的血管供血的器官中的局部缺血和组织破坏。动脉粥样硬化病变在人体中发展了许多年，导致诸如冠状动脉和脑部的局部缺血性和血栓性疾病及心肌梗塞和脑梗塞的并发症。

动脉粥样硬化是心血管疾病(包括心肌梗塞，中风和外周动脉疾病)的主要原因。心血管疾病是工业国家发病率和死亡率的主要原因并在新兴国家中稳定发展，其中以冠状动脉硬化为主要的根本病理。目前的动脉粥样硬化的治疗在防止发病和并发症上并非完全有效的。

疾病的发生是由脂蛋白，主要是 LDL 在血管的细胞外基质聚集。这些 LDL 颗粒聚集并经氧化修饰。氧化的 LDL 是有毒的并且导致血管损伤。动脉粥样硬化在很多方面表现为对这一损伤的反应包括发炎和纤维化。

胆固醇的高血浆水平，特别是 LDL 高水平通常被认为是动脉粥样硬化发展的动力。而高密度脂蛋白(HDL)的高水平抵消了动脉粥样硬化的发展。HDL 因此被称为好的胆固醇而 LDL 被称为坏的胆固醇。简言之，LDL 将胆固醇转移到组织而 HDL 从组织吸收胆固醇并将其转移到肝脏，其在肝脏被降解。降低 LDL 和增加 HDL 的治疗策略被开发用于动脉粥样硬化的治疗。一个特别感兴趣并且有希望的策略涉及 HDL 突变的变体，叫做 ApoA-1<sub>Milano</sub>。这种 HDL 变体非常有效地从组织转移胆固醇，并且动物实验(Shah et al, 1998)和临床试验的结果证明它可以引起动脉粥样硬化斑块的负荷显著减少。

如 WO 02/080954 的背景技术中所总结的，Palinski et al (1989)在人体中鉴定出抗氧化的 LDL 的循环型自体抗体。这一观察结果表明动脉粥样

硬化可能是一种自体免疫疾病，由抗氧化的脂蛋白的免疫反应引起。同时，一些实验室开始在抗氧化的 LDL 的抗体滴度和心血管疾病中寻找关联。

发现抗氧化的 LDL 的抗体存在于心血管疾病的患者中，也存在于正常人中。这引导研究者通过免疫动物抗它们自身的氧化的 LDL 来研究抗血管壁中的氧化的 LDL 的自体免疫反应是否对动脉粥样硬化的发生有重要作用。该方法之后的思路是如果使用传统的免疫技术强化了抗氧化的 LDL 的自体免疫反应，其会导致血管发炎的增加和动脉粥样硬化的发展。为检测这一假设，用同源氧化的 LDL 对兔进行免疫，然后通过 16 周用高胆固醇饮食喂养动物增加动脉粥样硬化(Ameli et al, 1996; Freigang et al, 1998)。然而，与最初的假设相反，用氧化的 LDL 免疫有积极效果，减少大约 50% 动脉粥样硬化的发生。在后来的研究中也获得了相似的结果，其中高一胆固醇饮食与血管球囊损伤结合产生更强力的斑块形成(Nilsson et al, 1997)。综合可获得的数据来看，表明存在防止动脉粥样硬化形成的免疫反应并且其包括抗氧化的 LDL 的自体免疫。

这些观察到的事实表明了开发免疫治疗或用于治疗人体中基于动脉粥样硬化的心血管疾病的“疫苗”的可能性。一种方法，可以用他或她自身的、经氧化的 LDL 免疫个体，例如与铜接触。

Palinski et al, (1995)和 George et al, (1998) 已经表明抗氧化的 LDL 的免疫减少了动脉粥样硬化的发生。相似的，Zhou et al, (2001)证明与氧化形式的 LDL 中发现的表位反应的抗体防止动物模型中动脉粥样硬化的形成。

WO 02/080954 报道，用氧化形式的衍生自载脂蛋白 B-100(ApoB-100)的一些多肽接种倾向于形成动脉粥样硬化的动物，防止它们形成动脉粥样硬化。以前的实验证明结合到 LDL 颗粒中氧化的表位的抗体(Schipou et al, 2004)防止动物模型中动脉粥样硬化斑块的形成。进一步，结合到氧化的 LDL 的放射性同位素标记形式的抗体也可以用于实验动物中动脉粥样硬化病变的放射免疫显像(Tsimikas et al, 2000)。<sup>125</sup>I 标记的抗 MDA 赖氨酸表位的抗体用于检测鼠和兔中的斑块，并且发现注射的抗体定位于主动脉的斑块处。这表明抗氧化的 LDL 的免疫反应可能有保护作用。

并且，已显示，抗衍生自人 Apo-100 的 MDA-修饰性多肽的重组人抗体显著地抑制合适的动物模型中斑块的形成(Schiopu et al, (2004); WO

2004/030607)。对斑块形成的这一作用的潜在的机理是未知的，但是已经提出了对巨噬细胞激活和发炎的作用(Schiopu et al, 2004)。已知氧化的 LDL 激活巨噬细胞引起加速的发炎过程，该过程反过来诱导动脉粥样硬化 (Smith et al, 1995)。然而，没有期望，也没有任何实验证据表明抗氧化的 LDL 的免疫反应，或抗氧化的 LDL 的预制备的抗体反应的施用，可以引起先前存在的动脉粥样硬化斑块的消退。

之前的工作也证明抗衍生自 ApoB-100 的氧化的多肽的抗体及抗其他氧化的 LDL 表位(包括卵磷脂)的抗体可以防止实验动物中动脉粥样硬化斑块的形成(2004/030607; US6,716,410)。注射含有天然的抗 oxLDL 抗体的人免疫球蛋白的可用于减少 ApoE 缺陷小鼠中的动脉粥样硬化(Nicoletti et al, 1998)。

据我们所知，任何这些出版物的作者中没有人意识到抗氧化的 LDL 表位的抗体可以引起动脉粥样硬化斑块的消退，他们未提出这样的抗体可以用于人类患者的动脉粥样硬化斑块负荷的降低。

令人惊讶和出乎意料地，我们现在发现抗氧化的 LDL 表位的抗体不仅防止斑块形成，它们还诱导已经形成的动脉粥样硬化斑块的消退。这种抗体具有用于晚期动脉粥样硬化的治疗的潜力以有效地回复疾病进程，降低斑块负荷。

相似的，因为可以通过被动或主动免疫实现哺乳动物中特定的抗体滴度，先前存在斑块的消退可以通过两种方法的任一种获得。

因此，本发明涉及抗氧化的 LDL 的免疫治疗的用途，用于诱导个体中先前存在动脉粥样硬化斑块的消退。

免疫治疗可以是通过施用 LDL 氧化表位的主动免疫，；或通过施用抗 LDL 氧化表位的抗体的被动免疫。

“动脉粥样硬化斑块的消退”包括降低动脉粥样硬化斑块的大小和/或数量和/或程度。通常，动脉粥样硬化斑块的消退导致被斑块覆盖的动脉内表面的面积减少。因此，“动脉粥样硬化斑块的消退”包括个体中的全部斑块负荷降低，及个体的一些或全部的动脉粥样硬化斑块的大小的减小。动脉粥样硬化斑块的消退还导致管腔增加，有助于增加血流量。

用于测定个体中动脉粥样硬化斑块的大小和/或数量和/或程度的方法

对本领域技术人员来说是已知的，并且包括血管造影、血管超声、计算机断层扫描和核磁共振成像。

“降低大小和/或数量和/或程度”包括降低大约 1-25%，例如降低大约 1 或 2 或 3 或 4 或 5%，或更大的降低大约 6 或 7 或 8 或 9 或 10%，或降低 10-25%。更优选的是降低大约 25-50%，或 50-75%，或更多。

减少被动脉粥样硬化斑块覆盖的动脉内表面的面积，包括减少大约 1-25%，例如减少大约 1 或 2 或 3 或 4 或 5%，或更大的减少大约 6 或 7 或 8 或 9 或 10%，或减少 10-25%。更优选的是减少大约 25-50%，或 50-75%，或更多。

有效的动脉血管横截面的增加包括的含义为增加大约 1-25%，例如增加大约 1 或 2 或 3 或 4 或 5%，或更多增加大约 6 或 7 或 8 或 9 或 10%，或增加 10-25%。更优选的是增加大约 25-50%，或 50-75%，或 75-100%。最优选的，有效的动脉血管横截面增加 2-或 3-或 4-或 5-或 10-倍，或更多。显然地，动脉血管的横截面的增加程度依赖于治疗前的动脉粥样硬化病变导致的动脉堵塞的水平。

消退的动脉粥样硬化斑块，通常是那些在个体的主动脉中，也可以是在患者的其他动脉位置如股动脉、颈动脉和冠状动脉中的斑块。

优选的，免疫治疗是直接抗氧化的 LDL 的而不是天然 LDL 的表位。这样的表位可以用本领域技术人员已知的和在 WO 02/080954 中描述的方法检测。

更优选的，免疫治疗直接抗氧化的 LDL 中的 ApoB-100 的氧化表位。

氧化的 LDL 包含一些不同的表位，其可以被抗体识别。LDL 可以经氧化并通过多种不同化学反应降解改变。包括通过由氧、酶(例如髓过氧化物酶)、金属离子(例如  $Fe^{2+}$  和  $Cu^{2+}$ )、自由基和其他种类的化学压力的活性导致的不同种类的修饰导致的反应。

发现一些氧化的表位在 LDL 蛋白部分(Yang et al., 2001)，而其他的则是 LDL 颗粒中脂质的修饰。可以形成很多氧化性修饰的和生物学活性的磷脂(Heery et al, 1995; Friedman et al, 2002; Watson et al, 1999)。多不饱和脂肪酸转化为脂肪酸氢过氧化物，其迅速形成高度反应的产物例如丙二醛和 4-羟壬烯醛(Smiley et al, 1991)。这些种类的中间产物可以继续形成共价

的 Schiff 碱和 Michael 产物，同时赖氨酸存在于 LDL 的 ApoB-100 蛋白质中。发现活性乙醛还可以经卵磷脂部分中的酯键结合到脂肪酸上(Witztum & Berliner, 1998)。经常发现磷脂 1-棕榈酰-2-花生四烯酸酰 sn-甘油-3-磷酸胆碱(PAPC)是近端氧化产物，其在氧化的花生四烯酸的 sn-2 碳产生醛，得到 POVPC(1-棕榈酰-2-(5-氧)正戊酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱)。POVPC 可以与赖氨酸和含有胺的磷脂例如磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸反应。结果产生多种氧化脂蛋白和脂-脂加合物。一些这种氧化物通过酶催化，例如分泌磷脂酶(Leitinger et al, 1999)。其他酶-形成的变化例如硝化和 HOCL 加成是通过髓过氧化物酶进行的 (Carr et al, 2000)。所有新表位被认为是免疫原性的和生物学活性的(McIntyre et al, 1999; Esterbauer et al, 1991)。还有隐蔽表位，其是 LDL 颗粒的氧化修饰的结果但自身不被氧化(如磷脂胆碱和蛋白片段)，且是氧化 LDL 颗粒的标志并且这样的表位用免疫治疗是可以靶向的。

最近，本发明人开发了源自称为 n-CoDeR®的重组抗体片段库的人抗体，其抗衍生自人 ApoB-100 的氧化肽(WO 02/080954)。这些 ApoB-100 的肽表位出自 WO 02/080954 的表 1，并在下表 1 中列出。开发的抗体防止动物模型中动脉粥样硬化病变的形成(Schiopu et al, 2004; WO 2004/030607)。WO 2004/030607 中公开的抗氧化的 ApoB-100 抗体的序列，尤其是 IEI-A8、IEI-D8、IEI-E3、IEI-G8、KTT-B8 和 KTT-D6，将其以引用的方式并入本文中。为了避免不确定，在 WO 2004/030607 和 Schiopu et al, (2004)中描述的每一种抗体是本发明中可以使用的抗体的举例。

表 1

肽的名称	肽序列	<b><u>SEQ ID No:</u></b>
A 类 高 IgG, MDA-区别		
P 11.	FLDTVYGNCSHFVTRKKG	1
P 25.	PQCSTHILQWLKRVHANPLL	2

P 74.	VISIPRLQAEARSEILAHWS	3
B类 高 IgM, 无 MDA-区别		
P 40.	KLVKEALKESQLPTVMDFRK	4
P 68.	LKFVTQAEGAKQTEATMTFK	5
P 94.	DGSLRHKFLDSNIKFSHVEK	6
P 99.	KGTYGLSCQRDPNTGRLNGE	7
P 100.	RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ	8
P 102.	SLTSTSDLQSGIKNNTASLK	9
P 103.	TASLKYENYELTLKSDTNGK	10
P 105.	DMTFSKQNALLRSEYQADYE	11
P 177.	MKVKIIRTIDQMQNSELQWP	12
C类 高 IgG, 无 MDA 区别		
P 143.	IALDDAKINFNEKLSQLQTY	13
P 210.	KTTKQSFDSLVSVAQYKKNKH	14
D类 NHS/AHP, IgG-ak > 2, MDA 区别		
P1.	EEEMLENVSLVCPKDATRFK	15
P 129.	GSTSHHLVSRKSISAALEHK	16
P 148.	IENIDFNKSGSSTASWIQNV	17

P 162.	IREVTQRLNGEIQALELPQK	18
P 252.	EVDVLTkYSQPEDSLIPFFE	19
E 类 NHS/AHP, IgM-ak > 2, MDA 区别		
P 301.	HTFLIYITELLKKLQSTTVM	20
P 30.	LLDIANYLMEQIQDDCTGDE	21
P 31.	CTGDEDYTYKIKRVIGNMGQ	22
P 32.	GNMGQTMEQLTPELKSSILK	23
P 33.	SSILKCVQSTKPSLMIQKAA	24
P 34.	IQKAAIQALRKMEPKDKDQE	25
P 100.	RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ	26
P 107.	SLNSHGLELNADILGTDKIN	27
P 149.	WIQNVDTKYQIRIQIQEKLQ	28
P 169.	TYISDWWTLAAKNLTDFAEQ	29
P 236.	EATLQRIYSLWEHSTKNHLQ	30
F 类 NHS/AHP, IgG-ak < 0.5, 无 MDA 区别		
P 10.	ALLVPPETEEAKQVLFLDTV	31
P 45.	IEIGLEGKGFEPtleALFGK	32
P 111.	SGASMKLTTNGRFREHNAKF	33

P 154.	NLIGDFEVAEKINAFRAKVH	34
P 199.	GHSVLTAKGMALFGEGKAEF	35
P 222.	FKSSVITLNTNAELFNQSDI	36
P 240.	FPDLGQEQVALNANTKNQKIR	37
G 类 无 IgG 或 IgM 抗体水平		
P 2	ATRFKHLRKYTNYQAQSSS	38

如上文表 1 中所示，肽可以分组为具有共同特征的六种分类：

分类 A：产生高水平抗 MDA-修饰肽的 IgG 抗体的片段(n=3)。

分类 B：产生高水平 IgM 抗体的片段，但是在天然肽和 MDA-修饰肽中没有区别(n=9)。

分类 C：产生高水平 IgG 抗体的片段，但是在天然肽和 MDA-修饰肽中没有区别(n=2)。

分类 D：产生高水平抗 MDA-修饰肽的 IgG 抗体的片段并且 NHP 一池中的抗体是 AHP 一池中的至少两倍(n=5)。

分类 E：产生高水平抗-修饰肽的 IgM 抗体的片段并且 NHP 一池中的抗体是 AHP 一池中的至少两倍(n=11)。

分类 F：产生高水平的 IgG 抗体的片段，但是在完整的肽和 MDA 修饰的肽中没有区别，AHP 一池中的抗体是 NHP 一池中的至少两倍(n=7)。

明显的，ApoB-100 的肽片段可以用蛋白质化学方法制备，例如利用部分蛋白质水解(外切或内切)，或通过直接合成。任选的，变体可以通过重组 DNA 技术制备。合适的用于克隆、处理、修饰和表达核酸，和纯化表达蛋白的技术是所属技术领域已知的并且在例如 Sambrook et al (2001) “分子克隆，实验手册”，第三版，Sambrook et al (eds)，冷泉港实验室出版社，冷泉港，NY，USA 中被描述，在此将其以引用的方式并入本文中。

“肽”不仅包括其中氨基酸残基通过肽键(-CO-NH-)连接在一起的分子，还包括肽键被反转的分子。这种反转式拟肽可以用所属技术领域已知的方法制备，例如在 Meziere et al, 1997 中描述的那些方法。这种方法包括制备包括改变的假肽，所述的改变包括骨架，并且不包括侧链方向。至少对于 MHC II 类和 T 辅助细胞反应，这些假肽表现出是有效的。包含 NH-CO 键(而非 CO-NH 肽键)的反转式肽更耐蛋白质水解。类似地，可以完全无需肽键，如果使用合适的连接部分，其保留氨基酸残基的 C $\alpha$  原子之间的间距；特别优选地，如果连接部分具有基本相同的电荷分布和基本相同的肽键平面。而且明显地，肽可以方便地在其 N-或 C-末端封闭以有助于减弱对外切蛋白质消化的敏感性。

因此，发明包括了表 1 中列出的 ApoB-100 氧化的肽表位，或一个或多个这些肽的活性片段的用途，用于抗氧化的 LDL 免疫治疗以诱导先前存在的动脉粥样硬化斑块的消退，而不管是通过主动免疫或被动免疫(即施用抗这些氧化表位的抗体)。

明显地，为了接种目的，ApoB-100 肽可以以氧化的或非氧化的形式施用。这是因为体内施用，它们似乎变为氧化的。因此“施用 LDL 氧化表位”包括施用非氧化表位(其在体内被氧化)。

为了避免不确定，本发明中，用于被动免疫的抗体都连接到氧化的 LDL。

表 1 中列出的 ApoB-100 肽表位的“片段”含义为给定序列的至少 6 个连续的氨基酸。因此，片段可以包括 6 或 7 或 8 或 9 或 10 或 11 或 12 或 13 或 14 或 15 或 16 或 17 或 18 或 19 个连续的给定序列的氨基酸。“活性”片段是当被氧化时，其可以经主动或被动免疫治疗，用于在个体中产生诱导动脉粥样硬化斑块消退的抗体。实施例中提供用于检测任意的表 1 中列出的肽表位的特定片段是否是所描述的活性片段的方法。

本发明的一方面，免疫治疗包括对个体施用至少一种抗体，其选择性与 LDL 氧化表位结合。

因此，本发明包括在需要的个体中诱导动脉粥样硬化斑块消退的方法，方法包括对施用至少一种抗体，所述抗体选择性地与 LDL 氧化表位结合。

本发明还包括至少一种选择性地与 LDL 氧化表位结合的抗体在制备诱导个体动脉粥样硬化消退的药物中的用途。

在一个具体实施方式中,施用选择性地与 LDL 氧化表位结合的抗体包括对个体施用编码所述抗体分子的多核苷酸。

递送多核苷酸给患者的方法对所属技术领域的技术人员来说是已知的,包括利用免疫脂质体、病毒载体(包括疫苗、经修饰的疫苗和腺病毒),和通过直接递送 DNA,如使用基因枪和电穿孔。例如, Svensson et al, 1999, 描述了通过心肌内注射或冠状动脉内输注亲心性载体(cardiotropic vector)(例如重组性腺相关病毒载体),将重组基因递送到肌细胞,从而在体内导致了鼠心肌细胞中转基因的表达。MeIo et al (2004)评论了用于心脏疾病的基于基因和细胞的治疗。施用的可选的优选途径是经导管或支架。支架表现为局部基因递送的具有吸引力的可选办法,因为它们提供了用于延长的基因洗脱和有效的对动脉壁的转导平台。这种基因递送策略可以降低病毒载体的系统扩散从而降低宿主免疫反应。合成的和天然的支架包被已经表现出可以使基因洗脱延长且没有明显的负反应的潜能(Sharif et al, 2004)。

优选的,编码抗体分子的多核苷酸与引导抗体在动脉(优选在动脉壁)表达的靶向性序列和/或调控序列可操作地连接。因此,多核苷酸可以在受影响的个体中产生的特异性抗体。合适的靶向性序列和调控序列对于本领域技术人员来说是已知的。

我们希望能够瞬时调控细胞中多核苷酸的表达。因此,我们希望多核苷酸的表达直接或间接处于可调控的启动子的控制之下,例如当希望刺激或,更可能的,抑制(依赖于小分子作用是否激活或抑制所述启动子)源自多核苷酸的抗体的表达时,通过施用于患者的小分子的浓度进行控制。如果表达构建体是稳定的,即能够在患者的细胞中表达抗体(任何必须的调控分子存在下)至少一周,一、二、三、四、五、六、八个月或一年或多年,这种方法特别有用。因此,多核苷酸可以与可调控启动子可操作地连接。可调控启动子的举例包括下面的论文中所涉及启动子: Rivera et al (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96(15), 8657-62 (通过利用两种分离腺病毒或腺相关病毒(AAV)载体(一种编码可诱导的人生长激素(hGH)目的基因,另一种

编码雷帕霉素—调控的转录因子)而由雷帕霉素(一种口服的生物利用的药物)控制); Magari et al (1997) J Clin Invest 100(11), 2865-72 (通过雷帕霉素调控); Bueller (1999) Biol Chem 380(6), 613-22 (腺相关病毒载体的研究进展); Bohl et al (1998) Blood 92(5), 1512-7 (通过腺相关载体中强力霉素调控); Abruzzese et al (1996) J Mol Med 74(7), 379-92 (诱导因子, 如激素、生长因子、细胞因子、细胞抑制剂、辐射、热休克和相关的应答元件的研究进展)。

优选的具体实施方式中, 抗体分子是抗 LDL 氧化表位的抗体, 例如那些表 1 中列出的和在 WO 02/080954 中描述的。如 WO 02/080954 中所描述的, 肽可以通过与多种因子例如铁、氧、铜、髓过氧化物酶、磷脂酶、次氯酸接触、或通过丙二醛(MDA)修饰, 以模拟不同的氨基酸修饰, 其中所述修饰可以在 LDL 氧化过程中发生。或者, 其他本领域已知的方法可以用于氧化 LDL 表位。

和衍生自 MDA-修饰的 ApoB-100 的肽反应的人抗体的产生在 WO 02/090854 和 Schiopu et al(2004)中已经描述。如下面详细讨论的, 人或人样抗体也可以用其他本领域已知的方法产生, 包括免疫人免疫球蛋白基因座转基因的小鼠, 或通过具有期望的特异性的鼠抗体的人源化。

“与 LDL 氧化表位选择性结合的”抗体含义为抗体分子与 LDL 氧化表位的结合和非氧化的 LDL 相比以更强的亲和力结合。优选的, 抗体与 LDL 氧化表位以和非氧化的 LDL 相比至少 1.5, 或至少 2, 或至少 5, 或至少 10 或至少 50 倍更强的亲和力结合。更优选的, 抗体分子与 LDL 氧化表位以和非氧化的 LDL 相比至少 100, 或至少 1000, 或至少 10000 倍更强的亲和力结合。这样的结合可以通过本领域已知的方法检测, 例如 Biacore 系统之一。优选的, 抗体分子选择性结合 LDL 氧化表位且不与非氧化的 LDL 结合。

优选的, 如果抗体具有对它们的目标表位至少  $10^{-8}$  M 的亲和力, 而更优选具有更高亲和力的抗体。

已知体液免疫的保护作用通过叫做抗体的结构上相关的分子家族介导。抗体通过与抗原结合发挥它们的生物学活性。结合到抗原的抗体通常对一个抗原特异并且结合通常是高亲合性的。抗体由 B-淋巴细胞产生。血

液含有许多不同的抗体，各自衍生自 B 细胞的一个克隆并且各自具有不同的结构和对抗原的特异性。抗体存在于 B-淋巴细胞表面，血浆中，组织间液中和分泌液中，例如唾液和粘膜表面黏液。所有天然形成的抗体在它们的结构上大体相似，导致在物化特征上的某些相似性，例如电荷和溶解性。所有抗体具有两个相同轻链(每个轻链大约 24 千道尔顿)和大约各为 55-70 千道尔顿的两个相同重链的共同核心结构。一个轻链与每个重链连接，并且两个重链相互连接。轻链和重链都含有一系列重复同源单位，长度各为 110 个氨基酸残基，其单独以共有的球状基序折叠，叫做免疫球蛋白(Ig)域。通过两个重链关联形成的抗体域为疏水的。已知抗体，尤其是单克隆抗体当遇到不利的物理或化学条件时在轻链与重链结合的位点被剪切。因为抗体含有很多半胱氨酸残基，它们具有很多半胱氨酸-半胱氨酸二硫键。所有的 Ig 区含有具有三条或四条反平行多肽链的两层 beta-折叠。

尽管它们大体相似，基于物化特征，例如大小，电荷和溶解性，和它们结合于抗原的行为，抗体分子可以分为少量的不同种类和亚型。人体中，抗体分子的种类为：IgA, IgD, IgE, IgG 和 IgM，各个类型的成员是相同的同种型。IgA 和 IgG 同种型进一步细分为亚型 IgA1、IgA2 和 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。同种型的所有抗体的重链具有大的区域的氨基酸序列同一性，不同于属于其他同种型或亚型的抗体。IgG, IgE 和 IgD 以单体循环，而分泌形式的 IgA 和 IgM 分别是二聚体或五聚体，且通过 J 链稳定。一些 IgA 分子以单体或三聚体存在。

“抗体”或“抗体分子”不仅包括如上所述的所有的免疫球蛋白还包括它们的片段例如 Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv 和它们的保留抗原结合位点的其他片段。类似地，术语抗体通常包括经基因工程抗体衍生物，例如单链 Fv 分子(scFv)和结构域抗体(dAbs)。术语还包括抗体样分子，其可以用噬菌体展示技术或其他对结合到氧化的 LDL 或它的特定区域的分子的随机筛选技术制备。因此，术语抗体包括所有含有结构，优选肽结构的分子，所述结构为天然抗体识别位点的部分(即与表位或抗原结合的抗体部分)。

抗体的可变重链(V<sub>H</sub>)域和可变轻链(V<sub>L</sub>)域与抗原识别有关，这一事实首先通过早期蛋白酶酶解实验被认识到。进一步的证实是通过啮齿类抗体的“人源化”。啮齿类来源的可变区可以与人类来源的恒定区融合，这样

得到的抗体保留了啮齿类亲本抗体的抗原特异性(Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855)。抗原特异性是由可变区赋予并且不依赖于恒定区, 这是通过包括都含有一个或多个可变区的抗体片段的细菌表达的实验得知的。这些分子包括 Fab 样分子 Better et al (1988) Science 240, 1041); Fv 分子(Skerra et al (1988) Science 240, 1038);单链 Fv (ScFv)分子, 其中 VH 和 VL 成对区域通过柔性寡肽连接(Bird et al (1988) Science 242, 423; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879)和包含分离的 V 区 (Ward et al (1989) Nature 341, 544)的单结构域抗体 (dAbs)。与保留它们的特异性结合位点的抗体片段的合成相关的技术的综述参见 Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293-299。

“ScFv 分子” 含义为其中 VH 和 VL 成对域经过柔性寡肽连接的分子。工程化的抗体, 例如 ScFv 抗体, 可以用 J. Huston et al, (1988) "抗体结合位点的蛋白质工程: 在 E.coli 中制备的抗地高辛单链 Fv 类似物中特异活性的恢复, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, pp.5879-5883, 和 A. Pluckthun, (1991) "抗体工程; E.coli 表达系统的改进", Bio/technology 9(6): 545-51 中描述的技术和方法制备, 在此将其以引用的方式并入本文中。

使用抗体片段而非完整抗体的好处的数倍。片段更小可以提高药理学特性, 例如更好的渗透到目的位置。完整抗体的效应子功能(例如补体结合)被除去。Fab, Fv, ScFv 和 dAb 抗体片段都可以由 E.coli 在其中表达并分泌, 从而可以容易的制备大量片段。

完整抗体, 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段是“二价的”。 “二价的” 含义为抗体和 F(ab')<sub>2</sub> 片段具有两个抗原结合位点。相对的, Fab, Fv, ScFv 和 dAb 片段是单价的, 只有一个抗原结合位点。

优选抗体是单克隆抗体。在一些条件下, 特别是如果将抗体重复施用于人类患者, 优选单克隆抗体为人单克隆抗体或人源化单克隆抗体。

如在此描述的具有反应性的合适的单克隆抗体可以通过已知的技术制备, 例如在“单克隆杂交瘤抗体: 方法和应用” SGR Hurrell (CRC Press, 1982)中所公开的。

可以使抗体具有期望的特性包括, 如特异性和交叉反应性, 同种型, 亲和性和血浆半衰期。开发具有预先确定的特性的抗体的可能性随着单克

隆抗体技术的出现变得明显(Milstein and Köhler, 1975 *Nature*, 256: 495-7)。这项技术使用鼠杂交瘤细胞制备大量相同的, 但为鼠源的抗体。事实上, 大量临床前和临床试验已经开始使用鼠单克隆抗体用于治疗如癌症。然而, 由于抗体是非人来源的, 患者的免疫系统将它们识别为异源的并产生针对它们的抗体。结果, 鼠抗体的效果和血浆半衰期减少, 并且经常, 由外源抗体引起的来自过敏反应的副作用妨碍了成功的治疗。

为了解决这些问题, 一些用于减少特异的潜在的治疗抗体的鼠源成分的方法被采用。第一种方法包括制备所谓的嵌合抗体, 其中抗体的鼠源的可变区转化到人源恒定区得到一种主要为人源的抗体(Neuberger et al, 1985, *Nature* 314: 268-70; Neuberger et al, 1998, 8<sup>th</sup> International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799)。

这种方法的进一步改进为开发人源化抗体, 其中结合抗原的鼠源抗体区域和互补决定区(CDRs)转化到人抗体框架。这样的抗体几乎完全是人源的并且当施用于患者时, 很少引起任何有害的抗体反应。一些嵌合或人源化的抗体已经被注册为治疗药物并且现在广泛用于多种适应症(Borrebaeck & Carlsson, 2001, *Curr. Opin. Pharmacol.* 1: 404-408)。

优选抗体为人源化的抗体。合适的制备的非人源抗体可以用已知方法“人源化”, 例如通过将鼠源抗体的 CDR 区插入到人源抗体的框架中。人源化的抗体可以用 Verhoeyen et al (1988) *Science*, 239, 1534-1536, 和 Kettleborough et al, (1991) *Protein Engineering*, 14(7), 773-783 中描述的技术和方法制备。

完全人抗体可以用重组技术制备。通常, 使用包含数十亿种不同抗体的大的文库。相对于用于如鼠源抗体的嵌合或人源化的先前技术, 这种技术不依赖于动物免疫以产生特异性抗体。相反, 重组文库包含大量预制抗体的变体, 其中文库具有特异于任一抗原的至少一种抗体。因此, 使用这样的文库, 具有期望的结合特性的现有抗体可以被识别。为了以有效的方法发现文库中的好的结合子, 设计了不同的系统, 其中表型即抗体或抗体片段与它的基因型即编码基因相关联。最常见的被使用的这种系统为所谓的噬菌体展示系统, 其中抗体片段被表达, 并在纤维状噬菌体颗粒(同时携带编码展示的分子的遗传信息)的表面以噬菌体衣壳蛋白融合的形式展示

(McCafferty et al, 1990, Nature 348: 552-554)。对特定抗原特异的噬菌体展示的抗体片段可以通过与被怀疑的抗原结合而进行选择。然后分离的噬菌体可以被扩增并且编码所选抗体可变结构域的基因可以任意地转化为其他抗体形式，例如全长免疫球蛋白，并且用现有技术已知的合适载体和宿主细胞进行高度表达。

在噬菌体颗粒上展示的抗体特异性的形式可以是不同的。最常见的使用形式为 Fab(Griffiths et al, 1994. EMBO J. 13: 3245- 3260)和单链(scFv)(Hoogenboom et al, 1992, J Mol Biol. 227: 381- 388)，两者都包含抗体的不同抗原结合域。单链形式由可变的重链结构域( $V_H$ )组成，其中该重链结构域经柔性连接肽与轻链结构域( $V_L$ )连接(US 4,946,778)。在做治疗剂之前，抗体可以转化为可溶形式，如 Fab 或 scFv 并且以这样的形式分析。之后的步骤中，经鉴定具有期望的特性的抗体片段可以转化为其他形式，例如全长抗体。

目前，用于在抗体文库中产生变体的新方法已经存在(WO 98/32845; Soderlind et al (2000) Nature Biotechnol. 18:852-856)。衍生自该文库的抗体片段全都具有相同的框架区，而区别仅存在于它们的 CDRs 中。因为框架结构区是胚系序列(germline sequence)，衍生自文库或用相同技术制备的相似的文库的抗体的免疫原性特别低(Soderlind et al, 2000)。这一性质对于治疗性抗体很有价值，降低了患者对施用的抗体形成抗体的风险，从而降低过敏反应，封闭抗体产生的风险，并且使抗体具有长的血浆半衰期。

因此，开发用于人体的治疗性抗体时，现在，现代重组文库技术(Soderlind et al, 2001, Comb. Chem. & High Throughput Screen. 4: 409-416)的使用优先于更早的杂交瘤技术。

发现在 WO 02/080954 中和列举在表 1 中的肽可以用作抗原以产生具有预先确定的性质的完全人源抗体，其可能与用于诱导动脉粥样硬化斑块消退的治疗性抗体特别相关。当施用于患者中时，不希望所获得的完全人源抗体产生任何不期望的免疫反应。

某些优选的抗体包括结合到 ApoB-100 表位 P45(氨基酸残基 661-680)和/或 P143(氨基酸残基 2131-2150)的那些抗体。具有这些结合特异性的抗体包括 IEI-I3(Schiopu et al 2004)和 2D03 (实施例 2 中所述)。

抗体 IEI-E3 之前已经发现显著地抑制动物模型中斑块的形成(Schiopu et al, 2004)。我们现在发现(见实施例)其可以诱导动脉粥样硬化斑块的消退。我们还证明其他具有不同特异性的抗氧化的 LDL 的抗体, 即 2D03, LDO-D4 和 KTT-B8(不包括对照抗体 FITC-8)都可以明显降低主动脉中斑块的水平(相对于治疗开始前在治疗中所见到的斑块区域)。抗体的 CDR 序列在表 2 中列出。抗体 IEI-E3 和抗体 KTT-B8 的  $V_H$  和  $V_L$  序列在 WO 2004/030607 的图 3 中给出, 在此将其以引用的方式并入本文中。

表 2. 在抗 oxLDL 抗体中发现的 CDRs 的氨基酸序列

	<b>2D03</b>	<b>LDO-D4</b>	<b>IEI-E3</b>	<b>KTT-B8</b>
<b>H1</b>	FSNAWMSWVRQAPG (SEQ ID No: 39)	FSNAWMSWVRQAPG (SEQ ID No: 45)	FSDYYMSWVRQAPG (SEQ ID No: 51)	FSSYAMSWVRQAPG (SEQ ID No: 57)
<b>H2</b>	SSISVGGHRYYADSVKGR (SEQ ID No: 40)	SSISTSSNYIYYADSVKGR (SEQ ID No: 46)	SGVSWNGSRTHYADSVKGR (SEQ ID No: 52)	SSISSGRFIYYADSMK GR (SEQ ID No: 58)
<b>H3</b>	ARIRVGPSSGGARDY (SEQ ID No: 41)	ARVKKYSSGWYSNYAFDI (SEQ ID No: 47)	ARAARYSYYYGMDV (SEQ ID No: 53)	TRLRRGSYFWAFDI (SEQ ID No: 59)
<b>L1</b>	CSGSNTNIGKNYVS (SEQ ID No: 42)	CSGSSSIGNNFVS (SEQ ID No: 48)	CSGSSSNIGNNAVN (SEQ ID No: 54)	CSGSSSNIGGESVS (SEQ ID No: 60)
<b>L2</b>	ANSNRPS (SEQ ID No: 43)	DNNKRPS (SEQ ID No: 49)	GNDRRPS (SEQ ID No: 55)	SNNQRPS (SEQ ID No: 61)
<b>L3</b>	CASWDASLNGWV (SEQ ID No: 44)	CAAWDDSLNGWV (SEQ ID No: 50)	CQWTGTGRGV (SEQ ID No: 56)	CAAWDDSLNGWV (SEQ ID No: 62)

本发明另一方面，免疫治疗包括对个体施用至少一种 LDL 氧化表位。至少一种 LDL 氧化表位诱导抗氧化表位的免疫反应，从而诱导个体中动脉粥样硬化斑块的消退。换言之，至少一种 LDL 氧化表位作为疫苗以产生诱导被接种的个体的动脉粥样硬化斑块的消退的免疫反应。

本发明包括诱导需要的个体中动脉粥样硬化斑块的消退的方法，方法包括对个体施用至少一种 LDL 氧化表位。

本发明还包括至少一种 LDL 的氧化位在用于制备用于诱导个体中动脉粥样硬化斑块消退的药物中的用途。

通常，个体是哺乳动物，例如马(hores)、牛(cow)、羊(sheep)、猪(pig)、骆驼(camel)、犬(dog)或猫(cat)。更优选的，个体为人类个体。

人类个体尤其是患者，其患有与动脉粥样硬化相关的心血管疾病，或具有患有与动脉粥样硬化相关的心血管疾病的风险。术语“与动脉粥样硬化相关的心血管疾病”包括相关的医学上与动脉粥样硬化有关联的疾病，因为它们都是动脉粥样硬化病变的结果。可提及的与动脉粥样硬化有关的心血管疾病包括冠心病，和心肌梗塞和中风。

无论特定患者是否是期望通过治疗受益的患者可以由医生确定。

明显的，由于本发明的方法和用途导致先前存在的动脉粥样硬化斑块的消退，本发明包括降低患者中与动脉粥样硬化相关的心血管疾病的风险，该患者由于存在动脉粥样硬化斑块而具有发展所述的心血管疾病的风险。

具有与动脉粥样硬化相关的心血管疾病风险的患者可以具有可能导致或恶化心血管疾病或功能障碍的血胆固醇水平。

患者可以是由于多种风险因素(包括肥胖，吸烟，高血压，糖尿病和早发冠心病家族史)而具有发生心血管疾病的风险的患者；有以非常高的血胆固醇和/或甘油三酯浓度为特点的家庭症状的患者；具有高血脂症的患者，其中所述的高血脂症不是继发于潜在的疾病(例如甲状腺功能减退症，肾病综合征，肝病或酒精中毒)来说非次要的；具有增高的 LDL-胆固醇的患者；或处于饮食降血脂干预(辅助治疗)下的患者。

进一步地，由于本发明的方法和用途导致先前存在的动脉粥样硬化斑块的大小的减小，本发明对于治疗晚期或严重动脉粥样硬化的患者，和晚

期或严重形式的与动脉粥样硬化相关的心血管疾病的患者特别有效。

在具体实施方式中，本发明可以包括检测个体中动脉粥样硬化斑块的大小和/或数量和/或程度的前期步骤。可以进行该步骤以评估个体是否需要治疗或降低他的动脉粥样硬化斑块负荷，或提供基线测量以评估这些治疗的效果，或为了这两种目的。

因此，本发明可以考虑包括鉴定具有需要降低的动脉粥样硬化斑块负荷的患者的方法，并且之后给患者施用至少一种选择性结合 LDL 氧化表位的抗体，或至少一种 LDL 氧化表位。

需要降低的动脉粥样硬化斑块负荷可以归为全部斑块负荷的大小和/或程度。另外的或可选的，其可以归纳为斑块的性质，例如，它们不稳定的程度。

本发明还被认为包括至少一种选择性与 LDL-氧化表位结合的抗体，或至少一种 LDL 氧化表位，在制备用于在诱导通过测量个体中动脉粥样硬化斑块的大小和/或数量和/或程度被评估为需要治疗的个体中诱导动脉粥样硬化斑块的消退的药物中的用途。

任选的，和通常的，本发明还可以包括后续步骤，即在施用至少一种选择性与 LDL 氧化表位结合的抗体，或至少一种 LDL 氧化表位后，检测患者中动脉粥样硬化斑块的大小和/或数量和/或程度，与治疗前进行的基线测量相比较，以评估有效性。

施用至少一种选择性与 LDL 氧化表位结合的抗体至患者的剂量通常可以由医生确定，该确定是基于，例如对被治疗的患者的动脉粥样硬化状态，所施用的其他治疗剂，患者的年龄，性别和体型等考虑的。特别地，施用至病人的至少一种 LDL 氧化表位的剂量可以由医生确定，该确定是基于被治疗的患者的体重。

他汀类(3-羟基 3-甲基戊二酰-辅酶 A(HMG-CoA)还原酶的抑制剂)已经被证明通过减少血浆胆固醇含量(和通过待阐明的其他的机理)在预防急性心血管疾病中有效。与上面描述的免疫治疗联合的他汀类施用是辅助动脉粥样硬化斑块的消退的有效治疗手段。优选的，选择两者剂量使具有协同效应。

本发明另一方面提供了在需要的个体中抵抗与动脉粥样硬化相关的

心血管疾病的方法，方法包括：通过对个体施用(a)选择性地与 LDL 氧化表位结合的至少一种抗体分子，或(b)至少一种 LDL 氧化表位诱导个体中动脉粥样硬化斑块的消退；和对个体施用他汀类。

本发明另一方面提供(a)选择性与 LDL 氧化表位结合的至少一种抗体分子或(b)至少一种 LDL 氧化表位在制备通过诱导动脉粥样硬化斑块的消退抵抗动脉粥样硬化相关的心血管疾病的药物中的用途，其中个体为对其施用他汀类的个体。

本发明有关的方面提供了他汀类在制备用于抵抗动脉粥样硬化相关的心血管疾病的药物中的用途，其中个体为对其施用(a)选择性与 LDL 氧化的表位结合的至少一种抗体分子，或(b)至少一种 LDL 氧化表位以诱导动脉粥样硬化斑块消退的个体。

本发明另一方面提供了用途：(a)选择性与 LDL 氧化表位结合的至少一种抗体分子，或(b)至少一种 LDL 氧化表位，和他汀类，在制备用于通过诱导动脉粥样硬化斑块消退抵抗与动脉粥样硬化相关的心血管疾病的药物中的用途。

进一步提供药物制剂包括：与药用可接受的佐剂、稀释剂或载体混合的(a)选择性与 LDL 氧化表位结合的至少一种抗体分子，或(b)至少一种 LDL 氧化表位，和他汀类。

本发明另一方面提供一种试剂盒部分，其包含组分：

(a)选择性与 LDL 氧化表位结合的至少一种抗体分子，或(b)至少一种 LDL 氧化表位；和他汀类，其中组分各自以适合于和其他组分联合施用的形式被提供。

“联合”包括的含义为组分可以适合于同时的或结合的对患者施用。然而，由于组分可能需要通过不同途径或以不同速率施用，“联合”还包括以相同的治疗策略连续施用或分别施用的含义。

合适的他汀类包括阿托伐他汀(atorvastatin)、西立伐他汀(cerivastatin)、氟伐他汀(fluvastatin)、洛伐他汀(lovastatin)、美伐他汀(mevastatin)、普伐他汀(pravastatin)、罗伐他汀(rosuvastatin)和辛伐他汀(simvastatin)。

本发明的具体实施方式中，抗体可以与抗炎剂偶联。合适的抗炎剂包括类固醇化合物例如地塞米松、倍他米松、强的松、泼尼松龙、曲安西龙、

氢化可的松、阿氯米松、安西奈德、双氟拉松等和非类固醇类抗炎剂。用于将诸如上面列出的抗炎剂的化合物偶联至抗体的方法是本技术领域已知的。

本发明另一方面提供了一种在个体中诱导动脉粥样硬化消退的抗体的鉴定方法，方法包括：提供选择性与 LDL 氧化表位结合的抗体，并且在针对动脉粥样硬化斑块消退的分析中检测它，其中分析中动脉粥样硬化斑块的消退表明抗体是诱导动脉粥样硬化斑块消退的抗体。

动脉粥样硬化斑块消退分析可以在体内分析，如在实施例 2 或 4 中描述的动物模型所描述的。

优选的，被检测的抗体分离自如上所述的人抗体片段文库。

更优选的，被检测的抗体选择性与氧化的，特别是 MDA 修饰的，衍生自 ApoB-100 的肽结合。

可以将所鉴定的具有期望的动脉粥样硬化斑块消退的特性的抗体片段重建到其他抗体结构中，例如全长人免疫球蛋白，以用作治疗目的。

本发明还有一方面提供了诱导个体中动脉粥样硬化斑块消退的试剂的鉴定方法，方法包括：提供含有 LDL 氧化表位的药剂，将该试剂施用于有动脉粥样硬化斑块的个体，并且检测所述的试剂是否诱导动脉粥样硬化斑块的消退，其中动脉粥样硬化斑块的消退表明所述试剂是诱导动脉粥样硬化斑块消退的药剂。

所述个体可以是动脉粥样硬化的动物模型，例如实施例 2 或 4 中所描述的。可选的，所述方法可以用于试剂的临床试验，其中个体可以是具有动脉粥样硬化斑块的人类个体。

本发明最后一个方面是提供了抗体，该抗体包括：具有表 2 中所示的抗体 2D03 的相应的 CDR 氨基酸序列的至少一种互补决定区(CDR)，或者具有表 2 中所示的抗体 LDO D4 的相应 CDR 的序列的至少一种 CDR。

更优选的，抗体具有两个或三个或四个或五个 CDRs，其具有抗体 2D03 或 LDO D4 的相应 CDRs 序列。

如果抗体具有三个或四个具有抗体 2D03 或 LDO D4 的相应 CDRs 序列的 CDRs，优选抗体具有全部三个重链或全部三个轻链 CDRs，所述的全部三个重链或全部三个轻链 CDRs 具有抗体 2D03 或 LDO D4 的相应 CDRs

序列。

因此,本发明这方面包括抗体含有:三个轻链 CDRs,其具有抗体 2D03 的相应的三个轻链 CDRs 的序列,或三个重链 CDRs,其具有抗体 2D03 的相应的三个重链 CDRs 的序列,或三个轻链 CDRs,其具有抗体 LDO D4 的相应的三个轻链 CDRs 的序列,或三个重链 CDRs,其具有抗体 LDO D4 的相应三个重链 CDRs 的序列。

更优选的,抗体包含三个轻链 CDRs 和三个重链 CDRs,其具有抗体 2D03 的相应的 CDRs 的序列,或三个轻链 CDRs 和三个重链 CDRs,其具有抗体 LDO D4 的相应 CDRs 的序列。

如果抗体不含有所有六个具有抗体 2D03 或 LDO D4 的相应 CDRs 序列的 CDRs,优选 1, 2, 3, 4 或 5 个“不相同的”CDRs 中的一些或全部包括抗体 2D03 或 LDO D4 的相应 CDRs 的序列的变体。“变体”包括与所述的相应 CDR 的序列具有至少 50%序列同一性的变体,更优选至少 70%,更优选至少 80%或至少 90%或至少 95%。更优选的,变体与抗体 2D03 或 LDO D4 的相应 CDR 的序列具有 96%或 97%或 98%或 99%的序列同一性。特别地,“变体”CDR 序列与抗体 2D03 或 LDO D4 的相应 CDR 的序列具有 5 或 4 或 3 或 2 或仅 1 个不同的氨基酸残基。

本发明这方面包括抗体 2D03, 和抗体 LDO D4。

本发明还包括选择性与选择性结合抗体 2D03 或抗体 LDO D4 的氧化的 LDL 表位结合的抗体。用于检测任意给定抗体是否与选择性结合抗体 2D03 或抗体 LDO D4 的氧化的 LDL 表位选择性结合的抗体的方法是本领域技术人员已知的。

本发明还包括医药组成物含有根据本发明这方面的抗体和药用可接受的载体;根据本发明这方面用在药物中的抗体;和根据本发明这方面的抗体在制备用于诱导动脉粥样硬化斑块消退的药物中的用途。

所有在此引用作为参与的文献,全文被引用。

在本说明书中以前公开的文献的列出或讨论不必理解为所述文献是技术发展水平的一部分或是常识。

现在通过下列实施例和附图对本发明进行更详细的描述。

图 1 表示发光 ELISA 证明抗体 2D03 和 IEI-E3 与氧化的和天然形式的

LDL 和 ApoB-100 的结合。前缀 MDA 表示 LDL 和 ApoB-100 的 MDA-修饰形式，而 Na 表示这些物质的天然形式。Cu-LDL 表示铜-氧化的 LDL。用与过氧化物酶结合的抗人 IgG 检测结合(RLU=相对荧光单位)。

图 2 表示基于 ELISA 对抗体 2D03 和 IEI-E3 抗体与 MDA 修饰的人 ApoB-100 结合进行分析。对照对应于 FITC-8 抗体与相同抗原的结合。亲和力通过 Biacore 分析检测。

图 3 表示 IEI-E3 和 2D03 的单链片段(scFv)与许多不同的 MDA 修饰的抗原的结合。P2(氨基酸[aa]16-31); P45(aa 661-680); P129 (aa 1921-1940); P143 (aa 2131-2150); P210 (aa 3136-3155); and P301 (aa 4502-4521)是对应于人 ApoB-100 序列的特定区域的肽。对照肽是不相关的包含赖氨酸的肽(MDA 修饰的, 黑色)。数据以信号/ $10^5$  绘图。缩写在正文中定义。

图 4 表示用 2D03, IEI-E3 抗体和对照 FITC-8 抗体对人斑块进行免疫组织化学染色。结合抗体用结合抗抗体的辣根过氧化物酶和二氨基联苯胺染色进行检测。

图 5 表示动脉粥样硬化 ApoBec 小鼠的降主动脉中的斑块区域, 所述小鼠用对氧化的 LDL 特异的 2D03 和 IEI-E3, LDO-D4 和 KTT B 8 抗体进行处理。同种型匹配的 FITC-8 抗体用作对照。斑块区域通过油红 O 染色分析。数值表示为总斑块面积占降主动脉总面积的百分比。

图 6 表示用抗氧化的 ApoB-100 IgG 对人单核细胞衍生的巨噬细胞的处理阻断了 MCP-I 的释放。在人血清存在下预培养 10 天的人单核细胞衍生的巨噬细胞 用  $60\mu\text{g/ml}$  抗氧化的 ApoB-100 IgG1 克隆、阴性对照 IgG、或仅生理盐水处理 4 天, 如所指出的。分离悬浮液并用商业可获得的 ELISA 分析 MCP-I 含量。数据含义为用 SEM 获自四个供体的三个数值的平均值。

图 7 表示抗氧化的 ApoB-100IgG 对动脉粥样化样巨噬细胞的 MCP-I 封闭效果随时间变化是快速的和稳定的。人单核细胞或人单核细胞衍生的巨噬细胞获自两个供体(分别为圆形或正方形)。立即地(图表左边)或在人血清存在下预培养单核细胞 14 天后(图表右边), 用  $60\mu\text{g/ml}$  2D03 抗体(封闭的记号)或对照抗体(开放的记号)处理细胞。分离悬浮液并用商业上可获得的 ELISA 分析 MCP-I CC 趋化因子含量。数据的含义为用 SEM 的三个数值的平均值。

实施例 1: 对氧化的 LDL 上存在的表位具有高亲和性和特异性的人抗体的产生

与氧化的 LDL 特异性结合的人抗体片段选自 n-CoDeR 库, 基本如所描述的(Schiopu et al, 2004)。简要地; 文库用噬菌体展示表达并且针对与衍生自 ApoB-100 的生物素化的氧化的肽混合物结合进行选择。结合的噬菌体用亲和素包被的磁珠用 2-3 轮选出 (Soderlind et al, (2000) Nature BioTechnol. 18: 852-856)并且最后选择与 MDA-LDL 和铜氧化形式的 LDL 和 ApoB-100 结合的噬菌体。抗体与 MDA-LDL 和铜氧化形式的 LDL 和 ApoB-100 结合, 但不与它们的天然的, 非氧化的形式结合(图 1)。抗体的结合和亲和性在图 2 中示例, 其中抗体 2D03 的结合与抗体 IEI-E3 的结合对比。2D03 与 IEI-E3 的结合的特异性比较表明它们具有对 MDA-修饰的 ApoB-100 衍生肽的相似, 但非相同的特异性, 并且在分析中 2D03 给出了更高的信号(图 3)。

如图 4 中所示, 如通过组织化学分析的那样, 抗体还特异性地与人动脉粥样硬化斑块结合但不与正常组织结合。

实施例 2: 使用基于被动免疫的免疫治疗, 动物模型中的动脉粥样硬化斑块的消退

## 方法

### 抗体

用之前描述的方法 (Schiopu et al, 2004)将选择的具有期望特性的 scFv 转到全长人 IgG1 抗体框架(human IgG1 antibody format)。

### 鼠, 被动免疫和组织制备

来自 Jackson 实验室(Bar Harbor, ME, USA)的雄性 LDLR<sup>-/-</sup> ApoBec 小鼠(C57BL/6)用于该研究。从 4 周龄开始用高胆固醇饮食喂养小鼠(0.15% 胆固醇, 21%脂肪, 内酰胺 AB, Kimstad, Sweden)自由采食。在第一次免

疫前一周，饮食改为正常喂养。25 周龄时，一组小鼠处死以作为实验开始时的斑块形成水平的对照并且剩下的三组小鼠分别地腹膜内注射 1mg/剂量(0.5mL)抗 MDA 修饰的 ApoB-100 肽的人 IgG1 抗体或对照抗体。非特异的针对异硫氰酸荧光素(FITC-8)的人 IgG1 抗体用作对照。注射以一周为间隔并重复 2 次。

小鼠在 29 周龄时在麻醉状态下通过心脏刺破而采取放血法人道处死，所述麻醉是通过腹膜内施用 300  $\mu$ L 蒸馏水，芬太尼/氟阿尼酮和咪达唑仑(2:1:1, 体积/体积/体积)而实现的。按照 Histochoice (Amresco, Solon, Ohio)，用磷酸盐缓冲液全身灌注后，心脏被切除并于 4<sup>0</sup>C 储藏于 Histochoice 中直至处理。降动脉切除表层脂肪和结缔组织，纵向切开，并正面腔面向上安置于卵清蛋白(Sigma, St. Louis, Missouri)包被的载玻片上(称为平板制片)(Branen et al, 2001)。当地的动物管理和使用委员会核准了本研究中使用的实验方法。

### 斑块面积分析

染色和降动脉的平板制片中斑块面积的量化如以前描述的进行(Fredriksson et al, 2003)。斑块面积通过显微镜和电脑辅助测量(Image Pro Plus)直接测量并且结果表示为斑块面积/截面的平均值。

### 统计分析

数据记为平均值 $\pm$ 标准偏差。数据的分析用双侧曼-惠特尼检验进行。认为 $< 0.05$  具有统计学显著性。

### 结果

抗氧化的 LDL 的重组人 IgG1 抗体在实验中比较。之前已经表明抗体 IEI-E3 有效抑制 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠(Schiopu et al, 2004)中早期动脉粥样硬化的形成。针对抗异硫氰酸荧光素 FITC-8 的人 IgG1 抗体不与天然的或氧化的 LDL 结合，用作同种型对照。

抗体对动脉粥样硬化发展的作用在 LDLR ApoBec<sup>-/-</sup>小鼠中检验。小鼠在 25, 26 和 27 周龄接受 3 次每剂量 1mg 抗体的腹膜内注射，并且在最后

一次注射后 2 周处死，即在 29 周龄时。小鼠常规的健康状况不被抗体治疗影响。检验组和对照组在体重和胆固醇和甘油三酯的血浆水平上没有显著的区别(数据未出示)。在实验开始处死一组动物，为了检测斑块负荷的基线水平的目的。

动脉粥样硬化的程度在胸动脉和腹动脉的油红 O 染色正面制片中测量。如图 5 所示，与对照抗体和获自 25 周龄鼠的基线值比较，所有试验抗体诱导被治疗的动物中有效的斑块负荷的消退。证明抗体 2D03 的高水平消退，其与 FITC-8 对比为 51%有效( $p=0.0003$ )，与基线值对比为 60%有效( $p=0.003$ )。其他抗体与 FITC-8 组或基线值对比也明显降低了斑块负荷( $p<0.01$ )。

## 讨论

本实验表明在动物模型的降动脉中用抗氧化的 LDL 表位的重组人 IgG1 抗体的治疗明显降低了动脉粥样硬化斑块的负荷。更有效的结合子 2D03 似乎比 IEI-E3 或其他抗体具有更强的有效性，但是在抗体治疗组中斑块面积之间的区别并不明显。这一发现首次证明与氧化形式的 LDL 结合的抗体具有诱导动脉粥样硬化斑块消退的能力。

在许多实验中，在来自人体的血浆中发现的并且抗氧化的 LDL 的抗体与疾病程度，进展及活性程度有关(Tsimikas et al, 2001, Salonen et al, 1992, Maggi et al, 1993)。这些的抗体水平将来可以用作用于检测心血管患者中受损性斑块的存在标记 (Nilsson and Fredriksson, 2004, Nilsson and Kovanen, 2004)。

对心肌梗塞和中风具有高风险的患者需要直接，快速和有效的治疗。他汀类(HMG-CoA 抑制剂)通过降低血浆胆固醇含量和其他仍未阐明的机理在预防急性心血管疾病中是有效的。不断努力开发治疗的新方法(不是取代他汀类)可以通过用不同的、补充的机理增加它们的功效。

因此，直接的和立即有效的抗体治疗可能对威胁生命的脑血管或心脏突发的脆弱患者有效。在本实验中已经表明，通过将小鼠由西方式饮食转为正常喂养，之后通过用 3 个剂量的抗体治疗，动脉粥样硬化的程度在 4 周内减少 50%。如前所述，小鼠在治疗开始时已经有了复杂的动脉粥样硬

化斑块。

抗体治疗甚至可以在人体中比在小鼠中更有效。我们使用的抗体是针对人 oxLDL ApoB-100 而产生的人 IgG1 抗体。人与鼠的 ApoB-100 之间的并不完全同源，一定程度上削弱了人抗体与鼠 oxLDL 的结合。小鼠的免疫系统对外源人蛋白反应产生鼠抗人 IgG1 抗体，其与在安乐死时仍存在于血浆中的注射的抗体的量负相关，如之前已经表明的(Schipou et al, 2004)。这些抗体可以降低小鼠中人源 IgG1 治疗的效果，通过封闭它们的结合位点或通过诱导它们从循环中被清除。

### 实施例 3：用抗 LDL 氧化表位的抗体调节巨噬细胞炎性活性

抗氧化 ApoB-100(oxApoB-100)的抗体治疗的抗动脉粥样硬化作用的潜在的分子机理未被完全地描述。然而，斑块形成和斑块动态平衡(Li and Glass, 2002)中巨噬细胞的作用，以及抗 oxApoB-100 抗体的治疗降低体内斑块巨噬细胞的含量 (Schiopu *et al*, 2004)指出了调节巨噬细胞的补充和功能的机理。由 MCP-I 和它的受体 CCR2 导致的 MCP-I 途径是单核细胞和巨噬细胞浸润和迁移的最重要的趋化导向，并且以不同程度影响动脉粥样硬化过程(Charo and Taubman, 2004)。从而，我们验证了抗 oxApoB-100 的 IgG 的抗动脉粥样硬化的作用的可能包括 MCP-I 信号通路的干扰。

发现与用对照 IgG 处理的细胞相比用抗 oxApoB-100 IgG 处理人单核细胞衍生的巨噬细胞降低了 MCP-I 高达 60%以上(图 6)。抑制作用是可滴定的，并观察到在 30 至 60 $\mu$ g/ml 具有最大的效果。抗 oxApoB-100 抗体对成熟巨噬细胞的 MCP-I 封闭作用随时间变化是快速而稳定的(图 7)。

用抗 oxApoB-100 IgG 孵化后 24, 48, 72 或 96 小时分离的悬浮液的 MCP-I 浓度保持在一个低水平。相反，用对照 IgG 的 MCP-I 浓度随时间稳定增长。当抗体与新鲜的分离的单核细胞孵化时，MCP-I 封闭效果更明显(图 7)。与对照 IgG 处理的细胞相比，用抗 oxApoB-100 的 IgG 处理单核细胞 48 小时导致 MCP-I 浓度减少惊人的 60 倍。

抗 oxApoB-100 的 IgG 处理还表现出在转录水平调节 MCP-I 合成。新分离的单核细胞用抗 oxApoB-100 的 IgG 或对照 IgG 孵化两天。收获细胞并且分离 mRNA 并且用实时 PCR 定量。基因表达涉及 18sRNA。与用对

照 IgG 处理的细胞相比(数据未出示), 和抗 oxApoB-100 IgG 孵化两天的单核细胞表现出 MCP-I 的 mRNA 水平减少 80%。

抗 oxApoB-100 的 IgG 的 MCP-I 封闭作用不是由于通常的细胞毒作用。用抗 oxApoB-100 的 IgG 处理后收获的巨噬细胞是完全具有活力的, 其可以通过台盼蓝染色和随后的光学显微镜分析来确定。

我们的发现表明抗 oxApoB-100 抗体的抗动脉粥样硬化作用包括对单核细胞和巨噬细胞释放 MCP-I 的抑制作用。MCP-I 对于健康人和病人中单核细胞和巨噬细胞的补充和迁移是关键。特别地, 单核细胞/巨噬细胞 tropic CC 趋化因子 MCP-I(Gu et al, 1998)或它的相应的受体 CCR2(Boring et al, 1998)的除去防止小鼠体内动脉粥样硬化。用 MCP-I 在体外刺激单核细胞表现出促进单核细胞跨血管内皮迁移, 并且在 oxLDL 存在下表现出促进巨噬细胞泡沫细胞转化(Tangirala et al, 1997)。不希望被理论束缚, 抗 oxApoB-100 的治疗可提供 MCP-I 释放的选择性抑制, 从而使抑制单核细胞向与动脉粥样硬化斑块无关的炎性位置迁移的潜在副作用最小化。

实施例 4: 用基于主动免疫的免疫治疗诱导动物模型中动脉粥样硬化斑块的消退

之前, 已经表明用 oxLDL (Palinski et al, 1995, Ameli et al, 1996, Freigang et al, 1998, Zhou et al, 2001, Nilsson et al, 1997)或 ApoB-100 肽 (Fredriksson et al, 2003)免疫在小鼠中有效, 并且产生抗动脉粥样硬化的疫苗的研究正在进行中(Nilsson et al, 2004; Hansson 2002; Sherer & Shoenfeld 2002; Zhou & Hansson 2004)。

为了研究抗衍生自氧化的 ApoB-100 的肽的接种减小动脉粥样硬化斑块大小的能力, LDLR-/-ApoBec 小鼠从 4 周开始用高脂肪饮食喂养 21 周。当小鼠 25 周大时, 处死一组动物并且它们降动脉中的动脉粥样硬化的程度被检测。这组作为基线组, 其他组中的动脉粥样硬化的程度可以与其比较。取消用肽或仅用 PBS 接种的实验动物的高脂肪饮食, 并注射肽或 PBS 数周, 之后处死动物并且检测动脉粥样硬化水平。

实施例 2 中, 如上, 我们证明了当动物取消高脂肪饮食时, 斑块负荷

的程度从 25 周到 29 周的 4 周都是稳定的。分析显示 25 周龄时，基线动物的降动脉面积的 10%被斑块覆盖。被接种的动物表现出与对照组和基线组相比降低的斑块负荷。这证明针对氧化形式的 LDL 中发现的表位的免疫导致先前存在的斑块负荷降低并且表明接种疫苗对于降低患者中的斑块负荷可能是一种有效的方式。

### 参考文献

1. Ameli S, *et al* (1996) Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits (对高胆固醇血症兔进行同源 LDL 和氧化的 LDL 免疫对早期动脉粥样硬化的作用). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Aug;16(8):1074-9
2. Boring, L., *et al* (1998) Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis (在动脉粥样硬化发生时趋化因子在 CCR2<sup>-/-</sup>小鼠中减少损害形成的作用). *Nature* 394, 894-7
3. Brånén, L., *et al*, A procedure for obtaining whole mount mouse aortas that allows atherosclerotic lesions to be quantified (获得完全固定的鼠动脉的方法以量化动脉粥样硬化损害). *Histochem J*, 2001. 33: p. 227-229
4. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection (用髓过氧化物酶和活性氮氧化 LDL: 反应途径和抗氧化剂保护). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jul;20(7):1716-23
5. Charo, IF and Taubman MB. (2004) Chemokines in the pathogenesis of vascular disease (趋化因子在血管疾病发病作用中的研究). *Circ Res.* 95(9):858-66

6. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes (4-羟壬烯醛, 丙二醛和相关醛的化学和生物化学). *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81-128
7. Fredrikson, G.N., *et al*, Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunisation with ApoB-100 peptide sequences (通过 ApoB-100 肽序列免疫防止 apoE-null 小鼠中的动脉粥样硬化). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23: p. 879-884
8. Freigang S, *et al* (1998) Immunization of LDL receptor-deficient mice with homologous malondialdehyde-modified and native LDL reduces progression of atherosclerosis by mechanisms other than induction of high titers of antibodies to oxidative neoepitopes (同源的丙二醛-修饰的 LDL 和天然 LDL 免疫 LDL 受体-缺乏小鼠降低动脉粥样硬化进展由于机理而非对高滴度抗体的氧化新表位的诱导). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Dec;18(12):1972-82
9. Friedman P, *et al* (2002) Correlation of antiphospholipid antibody recognition with the structure of synthetic oxidized phospholipids. Importance of Schiff base formation and aldol concentration (识别合成的氧化磷脂结构的抗磷脂抗体的相互关系, Schiff 碱形成和羟醛含量的重要性). *J Biol Chem.* 2002 Mar 1;277(9):7010-20
10. George, J., *et al*, "Hyperimmunisation of apo-E-deficient mice with homologous malondialdehyde low-density lipoprotein suppresses early atherogenesis (用同源丙二醛低密度脂蛋白超免疫 apo-E-缺乏小鼠抑制早期动脉粥样硬化形成). *Atherosclerosis*, 1998. 138(1): p. 147-52
11. Gu, L., *et al* (1998) Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice (单核细胞

- 趋化蛋白-1 的缺乏降低低密度脂蛋白受体-缺乏小鼠中的动脉粥样硬化) .  
*Mol Cell* 2, 275-81
12. Hansson, G.K., Vaccination against atherosclerosis: science or fiction? (抗动脉粥样硬化的疫苗: 科学或科幻?) *Circulation*, 2002. 106(13): p. 1599-601
13. Heery JM, *et al.* (1995) Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells (含有磷脂的氧化修饰 LDL 具有血小板-活性因子样活性并刺激平滑肌细胞生长). *J Clin Invest.* 1995 Nov;96(5):2322-30
14. Li, A.C. and Glass, C.K. (2002) The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention (巨噬泡沫细胞作为治疗性干涉的目标). *Nat Med* 8, 1235-42
15. Leitinger N, *et al* (1999) Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 2. Potential involvement of biologically active oxidized phospholipids (动脉粥样硬化中组 II 分泌磷脂酶 A2 的作用: 2. 潜在包含生物学活性氧化磷脂). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 May;19(5):1291-8
16. Maggi, E., *et al*, Specificity of autoantibodies against oxidised LDL as an additional marker for atherosclerotic risk (抗作为额外的动脉粥样硬化风险的标记的氧化的 LDL 的自身抗体的特异性). *Coron Artery Dis*, 1993. 4(12): p. 1119-22
17. McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Biologically active oxidized phospholipids (生物学活性的氧化的磷脂). *J Biol Chem.* 1999 Sep 3;274(36):25189-92
18. Meziere C, (1997) In vivo T helper cell response to retro-inverso peptidomimetics (体内 T 辅助细胞对逆反式拟肽反应). *J Immunol.* 1997 Oct 1;159(7):3230-7.

19. Nicoletti A, *et al* (1998). Immunoglobulin treatment reduces atherosclerosis in apo E knockout mice (免疫球蛋白治疗减轻 apo E 敲除小鼠中的动脉粥样硬化). *J Clin Invest*. 1998 Sep 1;102(5):910-8
20. Nilsson J, *et al* (1997) Immunization with homologous oxidized low density lipoprotein reduces neointimal formation after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits (同源氧化的低密度脂蛋白免疫减少高胆固醇兔中气球损害后新内膜的形成). *J Am Coll Cardiol*. 1997 Dec;30(7):1886-91
21. Nilsson, J. and G.N. Fredrikson, *Atherosclerosis*(动脉粥样硬化). *Autoimmunity*, 2004. 37(4): p. 351-5
22. Nilsson, J. and P.T. Kovanen, Will autoantibodies help to determine severity and progression of atherosclerosis? (自身抗体可以有助于检测动脉粥样硬化严重度和进展么? ) *Curr Opin Lipidol*, 2004. 15(5): p. 499-503
23. Nilsson, J., G.K. Hansson, and P.K. Shah, Immunomodulation of Atherosclerosis. Implications for Vaccine Development (动脉粥样硬化的免疫调节). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004
24. Nissen SE, *et al* (2003). Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial (重组 ApoA-I Milano 在患有急性冠状动脉综合征的患者中对冠状动脉粥样硬化的作用: 任意控制的试验) *JAMA*. 2003 Nov 5;290(17):2292-300
25. Palinski W, *et al* (1989) Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo (低密度脂蛋白在体内被氧化修饰). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Feb;86(4):1372-6
26. Palinski, W., E. Miller, and J.L. Witztum. Immunisation of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous

- malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis (用同源丙二醛修饰的 LDL 免疫低密度脂蛋白(LDL)受体缺乏兔减轻动脉粥样硬化). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(3): p. 821-5
27. Salonen, J.T., *et al*, Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis (抗氧化的 LDL 的自身抗体和颈动脉粥样硬化的研究进展). *Lancet*, 1992. 339(8798): p. 883-7
28. Schiopu A, *et al* (2004) Recombinant human antibodies against aldehyde-modified apolipoprotein B-100 peptide sequences inhibit atherosclerosis (抗醛修饰的载脂蛋白 B-100 肽序列的重组人抗体抑制动脉粥样硬化). *Circulation*. 2004 Oct 5;110(14):2047-52
29. Shah PK, *et al* (1998). Effects of recombinant apolipoprotein A-I(Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice (重组载脂蛋白 A-I(Milano)在载脂蛋白 E 缺乏小鼠中对大动脉粥样硬化的作用). *Circulation*. 1998 Mar 3;97(8):780-5
30. Sherer, Y. and Y. Shoenfeld, Immunomodulation for treatment and prevention of atherosclerosis (用于治疗 and 防止动脉粥样硬化的免疫调节). *Autoimmun Rev*, 2002. 1(1-2): p. 21-7
31. Smiley PL, *et al* (1991) Oxidatively fragmented phosphatidylcholines activate human neutrophils through the receptor for platelet-activating factor (氧化片段卵磷脂激活人嗜中性粒细胞经活性因子的受体). *J Biol Chem*. 1991 Jun 15;266(17):11104-10
32. Smith J, *et al* (1995). Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E (减少缺乏巨噬细胞集落刺激因子(op)和载脂蛋白 E 的小鼠中的动脉粥样硬化). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 92, pp. 8264-8268, August 1995
33. Tangirala RK, Murao K, Quehenberger O. Regulation of expression of the human monocyte chemotactic protein-1 receptor (hCCR2) by cytokines

- (通过趋化因子调节人单核细胞趋化蛋白-1 受体(hCCR2)的表达). *J Biol Chem*. 1997 Mar 21;272(12):8050-6
34. Tsimikas S, Shortal BP, Witztum JL, Palinski W. In vivo uptake of radiolabeled MDA2, an oxidation-specific monoclonal antibody, provides an accurate measure of atherosclerotic lesions rich in oxidized LDL and is highly sensitive to their regression (放射性标记的 MDA2 的体内吸收, 氧化的特异性单克隆抗体, 提供对富于氧化的 LDL 的动脉粥样硬化损害的准确测量并且其对它们的消退高度敏感). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Mar;20(3):689-97
35. Tsimikas, S., W. Palinski, and J.L. Witztum, Circulating autoantibodies to oxidised LDL correlate with arterial accumulation and depletion of oxidised LDL in LDL receptor-deficient mice (抗与动脉聚集相关的氧化的 LDL 的循环自身抗体和氧化的 LDL 在 LDL 受体缺乏小鼠中的衰减). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(1): p. 95-100
36. Watson AD, *et al* (1999). Structural identification of a novel pro-inflammatory epoxyisopropane phospholipid in mildly oxidized low density lipoprotein (温和氧化低密度脂蛋白中新促炎性环氧异前列腺素磷脂的结构鉴定). *J Biol Chem*. 1999 Aug 27;274(35):24787-98
37. Witztum JL, Berliner JA. Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis (动脉粥样硬化中的氧化磷脂和异前列腺素). *Curr Opin Lipidol*. 1998 Oct;9(5):441-8
38. Yang C, *et al* (2001) Selective oxidation in vitro by myeloperoxidase of the N-terminal amine in apolipoprotein B-100 (体内用髓过氧化物酶对载脂蛋白 B-100 的 N-末端胺的选择性氧化). *J Lipid Res*. 2001 Nov;42(11):1891-6
39. Zhou X, *et al* (2001) LDL immunization induces T-cell-dependent antibody formation and protection against atherosclerosis (免疫诱导 T-细

- 胞-依赖的抗体形成和防止动脉粥样硬化). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Jan;21(1):108-14
40. Zhou, X. and G.K. Hansson, Immunomodulation and vaccination for atherosclerosis (免疫调节和用与动脉粥样硬化的疫苗). *Expert Opin Biol Ther*, 2004. 4(4): p. 599-612.
41. Sharif F, *et al* (2004) "Current status of catheter- and stent-based gene therapy." (基于导管和支架的基因治疗当前的研究状况) *Cardiovasc Res.* 64(2): 208-16.
42. Svensson EC, *et al.* (1999) Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated virus vectors (心肌内注射或冠状动脉灌注后用重组腺相关病毒载体的心肌细胞的有效和稳定地转化). *Circulation.* 99: 201-5.
43. Melo LG *et al*, (2004) Gene and cell-based therapies for heart disease (基因和细胞为基础的脏疾病的治疗). *FASEB J.* 18(6): 648-63.

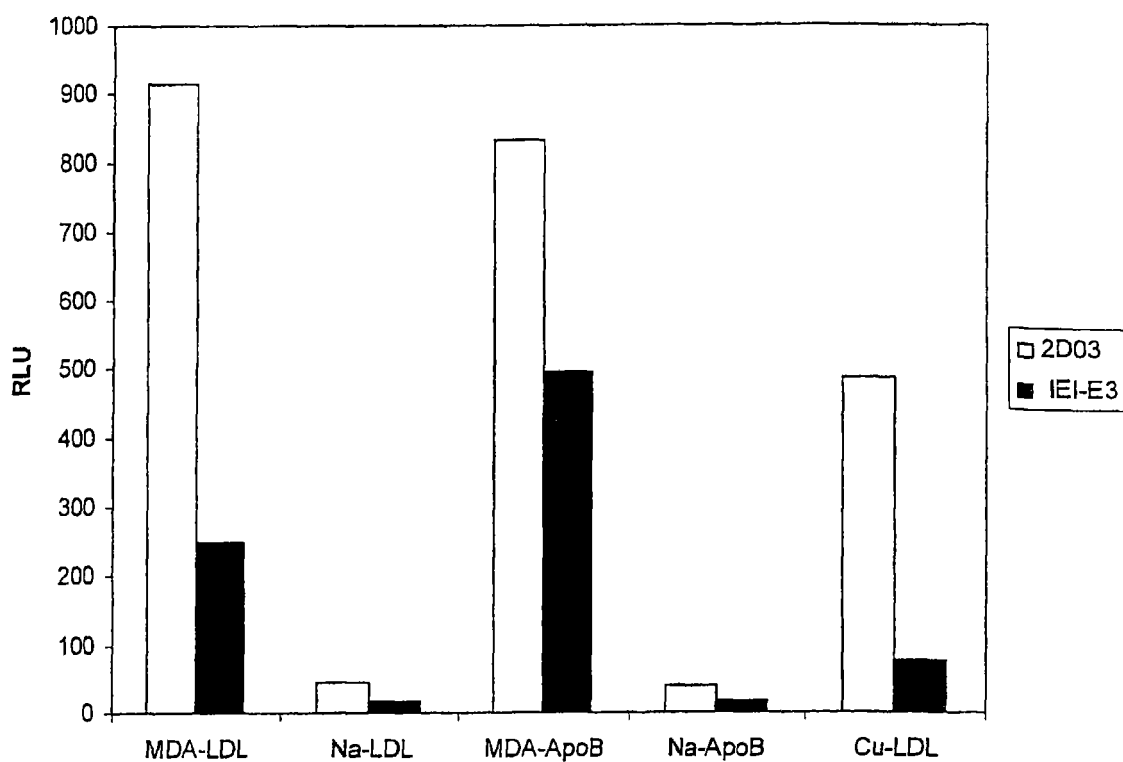


图1

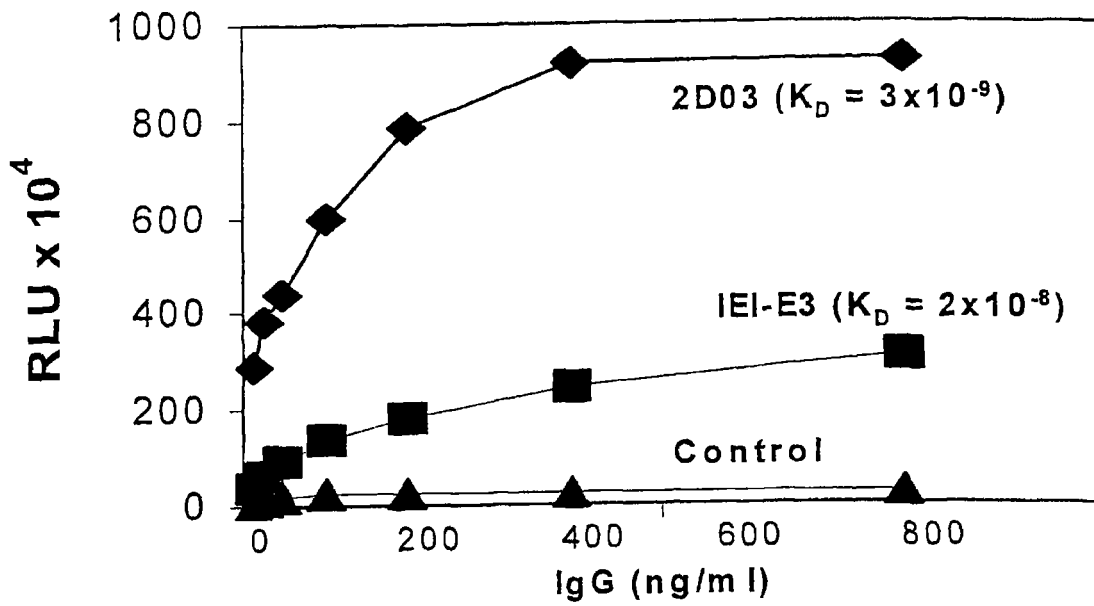


图2

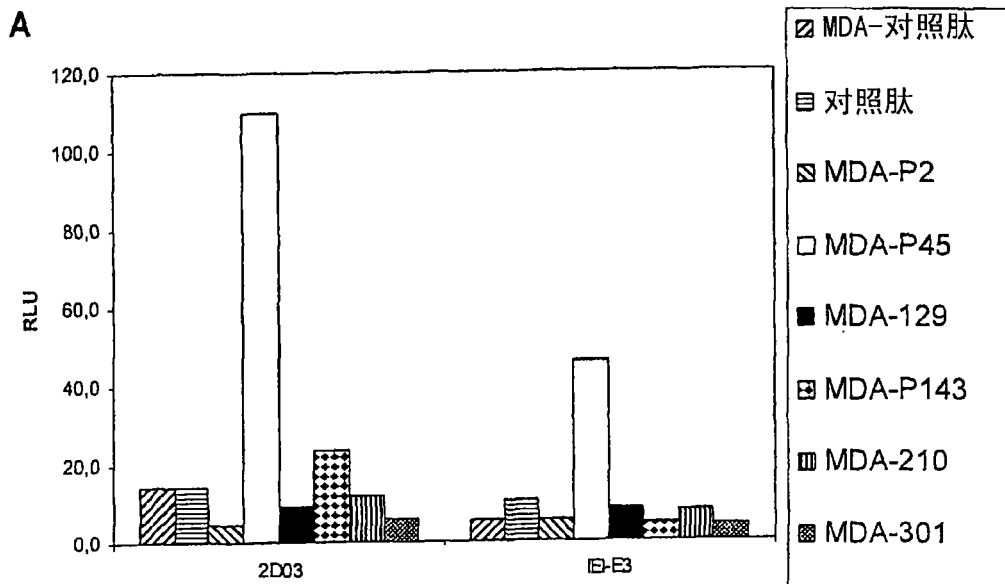


图3



图4

斑块消退

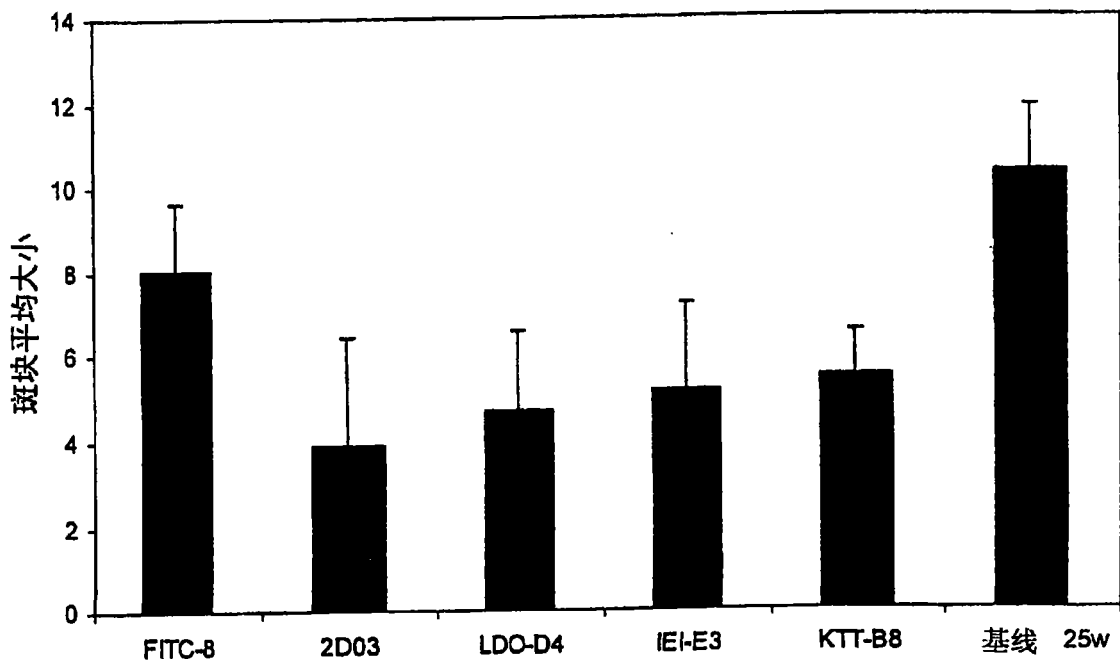


图5

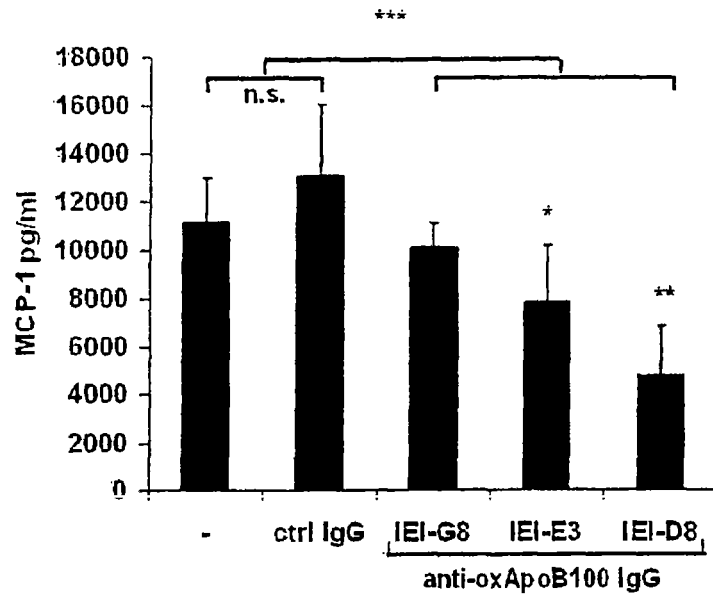


图6

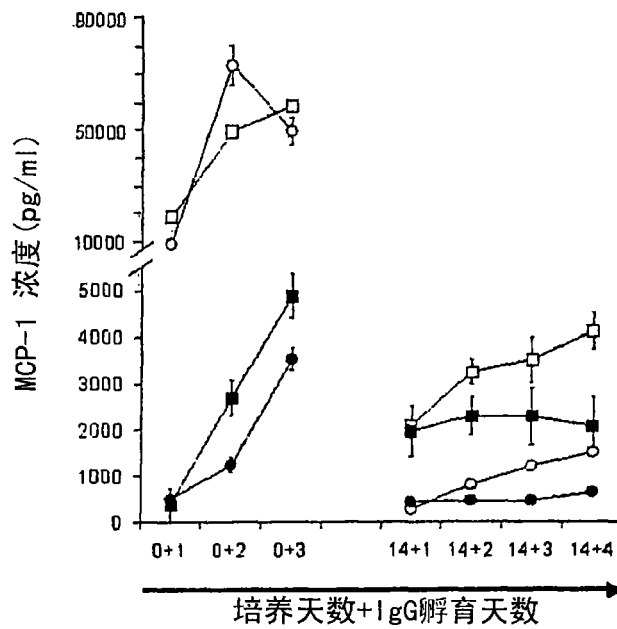


图7

专利名称(译)	用于诱导动脉粥样硬化斑块消退的免疫治疗		
公开(公告)号	<a href="#">CN101316863A</a>	公开(公告)日	2008-12-03
申请号	CN200680040006.5	申请日	2006-09-04
[标]申请(专利权)人(译)	生物发明国际公司		
申请(专利权)人(译)	生物发明国际公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物发明国际公司		
[标]发明人	罗兰·卡尔松 扬·尼尔松		
发明人	罗兰·卡尔松 扬·尼尔松		
IPC分类号	C07K16/18 A61K39/395 A61K39/00 A61P9/10 A61K31/33 G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/622 C07K2317/21 C07K2317/30 C07K16/44 A61K2039/505 A61K39/0012 Y02A50/407		
优先权	2005017878 2005-09-02 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

抗氧化的LDL的免疫治疗用于诱导个体中先前存在的动脉粥样硬化病变的消退的用途。免疫治疗可以是被动的免疫治疗，利用与氧化的LDL上存在的表位结合的抗体，或者是主动免疫治疗，利用用于诱导抗氧化的LDL上存在的表位的免疫反应的疫苗组合物。

斑块消退

