

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-502029

(P2005-502029A)

(43) 公表日 平成17年1月20日(2005.1.20)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	W
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543	5 8 1 Z
GO 1 N 33/577	GO 1 N 33/577	B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 53 頁)

(21) 出願番号	特願2003-502039 (P2003-502039)	(71) 出願人	503067111 ジェンフィ GENFIT
(86) (22) 出願日	平成14年6月4日 (2002.6.4)		
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月5日 (2003.12.5)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/006110		フランス国、エフ-59120 ルー、リ ユ・ユーゲン・アヴィネ 885、リル・ メトロポール、パルク・ユーラサンテ
(87) 国際公開番号	W02002/098919		
(87) 国際公開日	平成14年12月12日 (2002.12.12)		
(31) 優先権主張番号	01401445.0	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(32) 優先日	平成13年6月5日 (2001.6.5)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100075225 弁理士 篠田 文雄
		(72) 発明者	ナジブ・フリュジャール、ジャミラ フランス国、エフ-59211 サント、 リュ・クレマンソー 185

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アポBおよび非アポB含有粒子中のアポCIIIを測定する新規な方法

## (57) 【要約】

本発明は、アポBおよび非アポB含有リポ粒子内のアポリポタンパク質CIII(「アポCIII」)を測定する新規な方法に関する。本発明は、また、合成アポCIII製品、対応する抗体、それを含むキット、およびサンプル中のアポCIIIレベルを検出、定量及び/またはモニターするためのみならず、サンプル中のじゅく腫形成性リポ粒子レベルを定量及び/またはモニターするためのその使用にも関する。上記の化合物およびキットは、アポCIIIレベルまたは活性をin vitroもしくはin vivoで調整し、対象における脂質代謝を調節するために用いることもできる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生物学的サンプル中の、アポ C III、またはアポ B および非アポ B 含有リポ粒子内のアポ C IIIを検出する方法であって、( i ) アミノ酸配列 SEQ ID No. 1 を含む、実質的に純粋な合成ポリペプチドによる免疫感作によって得た抗体、または該抗体と実質的に同じ抗原特異性を有する該抗体のフラグメントもしくは誘導体に該サンプルを接触させる工程と、( ii ) 抗体 - 抗原免疫複合体の存在を検出する工程とを含む方法。

## 【請求項 2】

抗体 - 抗原免疫複合体の存在を E L I S A、R I A、サンドイッチ型イムノアッセイまたは直接イムノアッセイによって決定する、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

抗体 - 抗原免疫複合体の存在を比濁分析アッセイによって決定する、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 4】

アミノ酸配列 SEQ ID No. 1 を含む、実質的に純粋な合成ポリペプチドを、ヒトではない動物に注入し、抗体または抗体産生細胞を採取することによって抗体を得る、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 5】

抗体がポリクローナル抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 6】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

生物学的サンプル中のアポ C IIIまたはアポ C III含有リポ粒子を検出する方法であって、( i ) アミノ酸配列 SEQ ID No. 1 を含む、実質的に純粋な合成ポリペプチドに結合する抗体、または該抗体と実質的に同じ抗原特異性を有する該抗体のフラグメントもしくは誘導体に該サンプルを接触させる工程と、( ii ) アポ C III - 抗体免疫複合体の形成を比濁分析アッセイによって評価する工程とを含む方法。

## 【請求項 8】

抗体が、アミノ酸配列 SEQ ID No. 1 を含む、実質的に純粋な合成ポリペプチドを、ヒトではない動物に注入し、抗体を採取することによって得られたポリクローナル抗体である、請求項 7 記載の方法。

## 【請求項 9】

生物学的サンプルが血液サンプルまたは血清サンプルである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 10】

脂質代謝障害の素因、またはその発症の危険性がある個体を検出する方法であって、対象からのサンプル中のアポ C III、またはアポ B および非アポ B 含有リポ粒子内のアポ C IIIを、アミノ酸配列 SEQ ID No. 1 を含む実質的に純粋な合成ポリペプチドに結合する抗体、または該抗体と実質的に同じ抗原特異性を有する該抗体のフラグメントもしくは誘導体を用いて *in vitro* で検出する工程を含む方法。

## 【請求項 11】

対象における脂質代謝関連障害治療の効果をモニターする方法であって、該対象からのサンプル中の全アポ C III、ならびにアポ B および非アポ B 含有リポ粒子内のアポ C IIIのレベルを、アミノ酸配列 SEQ ID No. 1 を含む実質的に純粋な合成ポリペプチドに結合する抗体、または該抗体と実質的に同じ抗原特異性を有する該抗体のフラグメントもしくは誘導体を用いて *in vitro* で検出する工程を含む方法。

## 【請求項 12】

アミノ酸配列 SEQ ID No. 1 を含む実質的に純粋な合成ポリペプチドに結合する抗体、または該抗体と実質的に同じ抗原特異性を有する該抗体のフラグメントもしくは誘導体の使用であって、血清中のアポ B および非アポ B 含有リポ粒子内のアポ C IIIの濃度を調整する

10

20

30

40

50

化合物もしくは食餌を *in vitro* でスクリーニングするための使用。

【請求項 13】

アミノ酸配列 SEQ ID No. 1 を含む実質的に純粋な合成ポリペプチドに結合する抗体、または該抗体と実質的に同じ抗原特異性を有する該抗体のフラグメントもしくは誘導体と、抗原 - 抗体免疫反応を実施するための試薬とを含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アポリポタンパク質 C III (「アポ C III」) を検出かつ定量する方法に関するものである。本発明は、合成アポ C III 製品、対応する抗体、それを含むキット、ならび  
10  
にそれらの使用でもあり、サンプル中のアポ C III レベルを検出、定量及び / またはモニターするためのみならず、サンプル中のじゅく腫形成性リポ粒子レベルを定量及び / またはモニターするための使用に関するものである。上記の化合物およびキットは、アポ C III レベルまたは活性を *in vitro* もしくは *in vivo* で調整し、対象における脂質代謝を調節するために用いることもできる。

【0002】

アポ C III が、血漿トリグリセリドの代謝制御、およびじゅく腫形成性の可能性がある、トリグリセリドに富むリポタンパク質 (TRL) [1] の血漿濃度の決定に重要な役割を果たしていることが次々と明らかにされている。アポ C III、すなわち肝臓および腸が合成する 79 アミノ酸のタンパク質 [2] は、キロミクロン、超低密度リポタンパク質 (VLDL) および高密度リポタンパク質 (HDL) の構成要素である [3]。  
20

【0003】

アポ C III は、3 種類のイソ型: アポ C III<sub>0</sub>、アポ C III<sub>1</sub> およびアポ C III<sub>2</sub> として存在する。アポ C III<sub>0</sub> は、グリコシル化されていないが、アポ C III<sub>1</sub> およびアポ C III<sub>2</sub> は、グリコシル化されており、それぞれ、一つおよび二つのシアル酸残基を有する [4]。糖部分は、タンパク質鎖の第 74 トレオニンに O - グリコシド結合によって結合された、二糖類の - D - ガラクトシル [1 - 3] - N - アセチル - D - ガラクトサミンからなる [5]。ヒトの正常脂肪血漿中で、アポ C III<sub>0</sub>、アポ C III<sub>1</sub> およびアポ C III<sub>2</sub> は、それぞれ、全アポ C III の 14%、59% および 27% を占める。アポ C III のいくつかの変異体は、軽い高脂肪血症に関連する [6、7] が、ヒトアポ C III の糖鎖形成部位の突然変異誘  
30  
発が、その分泌および脂質結合に影響を及ぼすことはない [8]。

【0004】

アポ C III の血漿濃度は、血漿トリグリセリドのレベルと正の相関関係がある [9、10]。肝灌流による研究では、アポ C III が TRL の肝取込みおよびその残留を阻害することが示された [11、12] のに対して、*in vitro* の実験では、アポ C III がリポタンパク質リパーゼ (LPL) と肝リパーゼとの双方の活性を阻害することを示している [13 ~ 17]。したがって、アポ C III は、TRL の血漿における異化およびクリアランスを調整する。これは、アポ C III の血漿リポタンパク質分布が、冠動脈疾患 (CAD) の進行または重篤度に関する統計的に有意な独立予測因子であることを血管造影法の研究が示すように、病態生理学的に意義がある [18 - 20]。血漿 TRL 代謝におけるアポ C III  
40  
I の役割は、トランスジェニック動物での最近の研究結果によって、より明確にされている [21]。アポ C III を過剰発現するマウスにおける TRL の血漿中蓄積は、血漿 VLDL の減少およびキロミクロン残留物のクリアランスを伴い、それは明らかに、LDL 受容体 [22] または硫酸ヘパランプロテオグリカン [23] との TRL の結合が低下するためであることが示されている。アポ B 含有リポタンパク質の LDL 受容体に対する、アポリポタンパク質 C の阻害効果も立証された [24]。受容体結合の低下は、外来アポリポタンパク質 E の添加によって逆転された。免疫学および凍結電子顕微鏡測定による研究は、アポ C III がいくつかのアポ B 100 エピトープを遮蔽し、その立体配座を変えることを示している [23]。さらに、アポリポタンパク質 B を欠くアポ C III リポ粒子 (アポ C III L p 非 B) とアポリポタンパク質 B を含むアポ C III リポ粒子 (アポ C III L p B  
50

)との比率は、脂質分解活性、およびアテローム性動脈硬化によるプラークの安定化または減退と密接に結びついている [ 25 ]。

【 0005】

したがって、これらのデータは、アポCIIIの血漿レベルは、アテローム性動脈硬化感受性、およびCADの素因に關与する様々な病態生理学的条件と相関することを示している。したがって、アポCIIIレベルを検出、定量または調整するための化合物、方法およびキットの利用可能性が、治療、診断、スクリーニング及び/または実験の領域において意義深い価値を有することは、明確に明らかである。

【 0006】

免疫学的方法に基づいてアポCIIIを検出する、従前の方法は、従来技術に記載されている。特に、Kashyapら [ 10 ] は、アポCIIIの測定のための放射免疫アッセイ (RIA) に関する。しかし、報告された方法は、高価であり、放射性同位元素の取扱いを必要とする。Holmquist [ 26 ] は、アポCIIIを定量するための酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) を開示している。しかし、このアッセイは、低精度の試験であり、免疫親和性による抗体の精製、およびその標識化を必要とする。加えて、競合ELISAを用いるときは、純粋なアポCIIIまたはVLDLのリポ粒子を必要とする。また、低処理量である。Curryら [ 27 ] は、電気免疫アッセイ法 (EIA) を報告している。しかし、大量のポリクローナル抗体が必要とされ、このアッセイは低処理量のものであり、正確に決定するには、脂肪血サンプルの脱脂が必要になり得る。また、他の方法のように鋭敏ではない。

10

【 0007】

従来技術の上記の短所に加え、従来のアポCIIIイムノアッセイのもう一つの重要かつ困難な側面は、抗原の調製である。実際、未変性アポCIIIは、蓄えられたヒト血漿から単離しなければならない。そのような採取に理想的な患者は、空腹時キロミクロン血症 (V型リポタンパク質の表現型) を伴う重篤な内因性高トリグリセリド血症の患者である。そのような患者は、常に利用できるわけではなく、たとえこの高トリグリセリド血症の血漿でアポCIIIの精製を実施しても、このタンパク質は、数mgを得ることができるにすぎない。さらに、未変性アポCIIIを精製するには、Cタンパク質が「ウェットな」有機相に僅かに可溶であるため、脱脂段階には無水溶媒を用いなければならない。これは、アポリポタンパク質の回収を低下させ、いかなる定量情報も無効にする。また、脱脂の工程により過酸化物が生成され、精製されたアポリポタンパク質に人為的影響が生じる。未変性血漿からのアポCIII分離のもう一つの困難な側面は、このタンパク質を高い純度で得ることであり、その理由は、その他のアポCタンパク質 (アポCIおよびアポCII) およびアポAIIが、アポCIIIと同一のいくつかの物理化学的特性を有するからである。

20

30

【 0008】

ここに、本発明は、アポCIIIを生成するための新規な方策、およびこのアポリポタンパク質を検出かつ定量するための新規な方法を提供する。本発明は、全合成アポCIIIを用いて、有効な抗アポCIII抗体を生成する新規な方法を具体的に開示する。本発明は、そのような有効な抗体、それを含むキット、および血清もしくは血漿中の、全アポCIIIレベル、またはじゅく腫形成性もしくは非じゅく腫形成性リポ粒子 (LpBおよびLp非B) 内のアポCIIIを検出、定量、精製及び/またはモニターするためのそれらの使用も開示する。

40

【 0009】

本発明の特定の一つの目的は、SEQ ID No. 1の配列を有する、実質的に純粋な合成アポCIII、またはその免疫原性フラグメントもしくは誘導体に関する。

【 0010】

本発明のさらに一つの目的は、上記に定義された合成アポCIIIポリペプチドによる免疫感作工程を含む、抗アポCIII抗体を生成する方法に関する。本発明は、この方法に従って調製された抗体はもとより、より一般的には、上記に定義されたポリペプチドに結合する抗体、ならびにそのような抗体のフラグメントまたは誘導体も包含する。

【 0011】

50

本発明のもう一つの側面は、上記に定義された抗体（そのフラグメントまたは誘導体を包含する）を用いて、血漿もしくは血清サンプル中の、全アポC III、またはアポBまたは非アポB含有リポ粒子内のアポC IIIを検出もしくは投与方法である。

【0012】

本発明のもう一つの目的は、脂質代謝障害の素因、またはその発症の危険性がある個体を検出する方法であって、上記に定義された抗体（そのフラグメントまたは誘導体を包含する）を用いて、対象からのサンプル中の、全アポC III、またはアポBまたは非アポB含有リポ粒子内のアポC IIIをin vitroで検出する工程を含む方法である。

【0013】

本発明のもう一つの目的は、対象における、トリグリセリドに富むリポタンパク質の肝臓への取込みをモニターする方法であって、上記に定義された抗体（そのフラグメントまたは誘導体を包含する）を用いて、サンプル中のアポC III含有粒子をin vitroで検出する工程を含む方法である。

【0014】

本願のもう一つの目的は、対象におけるアテローム性動脈硬化の形成、発症または進行を検出もしくはモニターする方法であって、上記に定義された有効な抗体（そのフラグメントまたは誘導体を包含する）を用いて、該対象からのサンプル中の、アポC III、またはアポC III含有じゅく腫形成性粒子のレベルをin vitroで検出する工程を含む方法である。対象は、好ましくは哺乳動物、特にヒト、より好ましくは、CADのような脂質障害の発症の危険性がある対象、またはそのような疾患を有する対象である。

【0015】

上記に示したとおり、本発明は、SEQ ID No. 1の配列を有する、実質的に純粋な合成アポC IIIペプチド、またはその免疫原性フラグメントもしくは誘導体を開示する。用語「実質的に純粋な」は、ポリペプチドが、アポC III合成の際に生じるその他の副生物、特にその他のアポリポタンパク質、たとえばアポC I、アポC II、アポBおよびアポA IIを基本的に欠くことを示す。用語「合成の」は、ポリペプチドが、天然に産する分子ではなく、実施例に記載されるとおり、化学的工工程を用いた合成によって製造されていることを示す。因みに、本発明の合成ポリペプチドは、基本的に、グリコシル化されていない。

【0016】

ここで、本発明は、合成アポC IIIを、抗体を生成するために製造かつ使用できることを示す。本発明は、さらに、そのような抗体が、可溶性抗原としてであれ、リポ粒子に含まれてであれ、天然に産するアポC IIIに特異的に結合できることを示す。本発明は、そのような抗体が、アポC IIIの様々なイソ型に結合することができ、免疫沈降の特性を有することを示す。したがって、これらの合成ポリペプチド、および対応する抗体は、アポC IIIを検出かつ定量するのに有利な新規生成物を表す。

【0017】

より具体的には、本発明の合成ポリペプチドは、下記のとおり、SEQ ID No. 1を包含する：

【0018】

【表1】

SEQ ID NO: 1 : Ser-Glu-Ala-Glu-Asp-Ala-Ser-Leu-Leu-Ser-Phe-Met-Gln-Gly-Tyr-Met-Lys-His-Ala-Thr-Lys-Thr-Ala-Lys-Asp-Ala-Leu-Ser-Ser-Val-Gln-Glu-Ser-Gln-Val-Ala-Gln-Gln-Ala-Arg-Gly-Trp-Val-Thr-Asp-Gly-Phe-Ser-Ser-Leu-Lys-Asp-Tyr-Trp-Ser-Thr-Val-Lys-Asp-Lys-Phe-Ser-Glu-Phe-Trp-Asp-Leu-Asp-Pro-Glu-Val-Arg-Pro-Thr-Ser-Ala-Val-Ala-Ala

【0019】

実施例に例示されるとおり、このポリペプチドは、固相合成によって、特にBoc/Bz

1の方法[28]を用いて、有利に製造することができる。このアポCIIIの合成方法を用いると、その生成は、従来技術より10~100倍も速くなり、純度ははるかに高くなる。

#### 【0020】

用語「誘導体」は、一つまたはいくつかのアミノ酸残基の一つもしくはいくつかの突然変異、置換、欠失及びノもしくは付加を含み、実質的に同じ抗原特異性を保持しているポリペプチドを包含する。誘導体の代表的な例は、アポCIIIの多型性、スプライシング等々による配列変異体を包含する。最も好適な誘導体は、SEQ ID No.1に比して、多くとも5個の修飾されたアミノ酸残基を含む。それ以外の残基は、担体またはリンカー残基、保護基等々に相当し得る。さらに、ポリペプチドは、たとえば化学的、物理的及びノまたは酵素的修飾によって修飾して、その安定性を強化し、その免疫原性を増大させ、標識またはトレーサーを組み込む等々をなしてもよい。そのような修飾の例は、タグ(たとえばmyc)、標識(たとえば放射性標識、酵索性標識等々)の付加、糖鎖形成等々を包含する。

10

#### 【0021】

本ポリペプチドは、可溶性であってもよく、精製されていてもよく、また担体分子、たとえばKLHまたは血清アルブミン、またはその他の、ビーズ等々を包含するいかなる不活性(たとえば合成)分子を用いて複合体化してもよい。特定の実施態様では、ポリペプチドを、特に抗体産生に用いるために、担体にカップリングさせる。カップリングは、慣用の手法[29、30]に従って実施することができる。

#### 【0022】

本ポリペプチドは、また、いかなる異種ポリペプチド分子、たとえば生物学的活性分子とも、複合化または融合させ得る。異種とは、ヒトアポCIII分子に由来しない、いかなるポリペプチドも意味する。

20

#### 【0023】

本発明の具体的な実施態様は、SEQ ID No.1からなる合成ポリペプチドを含み、他のリポタンパク質を欠く組成物である。

#### 【0024】

このポリペプチドは、対照、標準としてスクリーニングアッセイもしくは滴定アッセイに、またはアッセイを校正するために用いてよい。また、いくつかの酵素活性(リポタンパク質リパーゼおよび肝リパーゼ)を調整するのに用いてもよい。また、抗アポCIII抗体を生成するのに特に適する。

30

#### 【0025】

因みに、本発明のさらに一つの目的は、上記に定義されたポリペプチドに結合する抗体にある。明らかに、結合は、特異的でなければならず、それは、該抗体がその他の抗原と特異的に結合してはならず、その他の抗原との結合が、上記アポCIIIペプチドとの特異的結合から識別できることを意味する。実施例に例示されるとおり、本発明の好適な抗体は、別個のリポタンパク質とは特異的に結合しない。この抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体であってよい。さらに、用語「抗体」は、そのフラグメントまたは誘導体、特に実質的に同じ抗原特異性を有する該モノクローナルまたはポリクローナル抗体のフラグメントもしくは誘導体を包含する。これらは、抗体フラグメント(たとえばFab、Fab'2、CDR等々)、ヒト化抗体、多機能抗体、単鎖抗体(ScFv)等々を包含する。これらは、動物の免疫感作、および血清(ポリクローナル)または脾臓細胞の採取(適切な細胞株との融合によってハイブリドーマを形成するため)を包含する、慣用の方法に従って生成してよい。

40

#### 【0026】

マウス、齧歯類、霊長類、ウマ、ブタ、ウサギ、家禽類等々を包含する、様々な種からポリクローナル抗体を生成する方法は、たとえばVaitukaitisら[29]に見出し得る。略述すると、抗原をアジュバント(たとえばフロイントアジュバント)と組み合わせ、代表的には皮下注射によって、動物に投与する。反復注射を実施してよい。血液サンプルを採取し、免疫グロブリンまたは血清を分離する。

50

## 【0027】

上記に列挙されたとおりの様々な種からモノクローナル抗体を生成する方法は、たとえばHarlowら [Antibodies: A laboratory Manual, CSH Press, 1988] またはKohlerら [Nature, 256 (1975) 495] (参照によって本明細書に組み込まれる)に見出し得る。略述すると、これらの方法は、動物を抗原で免疫感作した後、脾臓細胞を回収し、次いで、不死化細胞、たとえば骨髄腫細胞と融合させる工程を含む。得られたハイブリドーマは、モノクローナル抗体を産生し、限定希釈によって選別して、個々のクローンを単離することができる。抗体は、Wardら [Nature, 341 (1989) 544] に開示されたとおり、免疫グロブリンのコンビナトリアルライブラリーの選別によって生成してもよい。

## 【0028】

本発明の好適な抗体は、上記のとおり、好ましくはSEQ ID No. 1を含む、純粋な合成アポC IIIポリペプチドによるか、またはその免疫原性サブフラグメント、たとえば、少なくとも一つのエピトープを含むサブフラグメントによる免疫感作によって生成する。

10

## 【0029】

本発明は、抗アポC III抗体を生成する方法であって、SEQ ID No. 1のポリペプチド、またはその免疫原性フラグメントもしくは誘導体をヒトではない動物に注入し、抗体または抗体産生細胞を採取する工程を含む方法にも関する。この方法は、純粋な未変性アポC IIIを用いる、以前に開示された方法より単純であり、特異性および免疫沈降性に富む抗体を生成させる。特異性は、他の血液循環タンパク質との交差反応性の不在を示すことによって確認することができる。より一般的には、特異性は、抗体が他の抗原より高い親和性でアポC IIIと結合することを示す。実施例に例示されるとおり、本発明のポリクローナル抗体は、免疫沈降性を有し、そのため、アポC IIIを高い効率で検出または投与するのに用いることができる。

20

## 【0030】

抗体は、異種部分、たとえば毒素、標識、薬物その他の治療剤に、共有結合によって、またはよらずに、直接に、またはカップリング剤もしくはリンカーの使用を通じてのいずれかによりカップリングさせてもよい。標識は、放射性標識、酵素、蛍光標識、磁性粒子などを包含する。毒素は、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素等々を包含する。薬物または治療剤は、リンホカイン、抗体、アンチセンス、成長因子等々を包含する。そのような異種部分を用いる方法は、たとえば米国特許第4,277,149号および第3,996,345号明細書に例示されている。

30

## 【0031】

本発明の抗体は、治療、診断、精製、検出、予防等様々に適用することができる。

## 【0032】

*in vitro*では、スクリーニング剤としてか、または様々な生物学的サンプル(たとえば血液サンプル)を包含する、様々なサンプルから抗原を精製するのに用いることができる。また、対象から採取されたサンプル、代表的には哺乳動物、具体的にはヒトである対象からの血液サンプル中の、全アポC III、またはアポBおよび非アポB含有リポ粒子内のアポC IIIの存在(または量)を、定量もしくは検出するのに用いることができる。

## 【0033】

因みに、本発明のもう一つの目的は、生物学的サンプル中のアポC III、またはアポBおよび非アポB含有リポ粒子内のアポC IIIを検出する方法であって、サンプルを、上記に定義された抗体(そのフラグメントまたは誘導体を包含する)に接触させる工程と、抗体-抗原免疫複合体の存在を検出する工程とを含む方法である。代表的には、この方法によれば、サンプル中の免疫複合体の(相対)量を評価し、それを、たとえば標準的条件または校正曲線と比較することによって、サンプル中の全アポC III、またはアポBおよび非アポB含有リポ粒子内のアポC IIIのレベルを決定する。この方法は、慣用のいかなる手法、たとえばELISA(直接または競合イムノアッセイ)、RIA、EIA等々を用いて実施してもよい。しかし、最も好適な実施態様では、その方法は、比濁分析アッセイである。実際、上記に示したとおり、抗体は特異的であり、サンプル中のアポC IIIを免疫

40

50

沈降させることができる。

【0034】

比濁分析アッセイでは、懸濁液中の粒子が散乱する光の強さを、分析装置を用いて測定する。粒子は、特異的な抗体を特異的な抗原に接触させたときに、重合体増強緩衝液中で生じる免疫沈降反応によって形成される。抗原と、該抗原に特異的な抗体との複合体形成は、初めは徐々に、次いで急速に上昇する速度で発生し、最後に、抗原の濃度に比例するピーク値に達し、進行する。このアッセイは、散乱された光の信号からの最大変化率を基準とし、それを抗原の濃度に相関（かつ変換）させることができる。代表的には、比濁分析アッセイは、英数字表示装置に結果を提示する、Beckmanの免疫化学装置系（IMMAGE）を用いて実施する。本発明の比濁分析アッセイは、迅速かつ再現可能であり、高処理量ベースで実施できる点で有利である。実際、このアッセイは、各サンプルについて、従来技術のほとんどの手法では、一日かかるのに対して、僅か数秒で実施でき、変動係数は、従来技術に記載されたアポCIII検出アッセイが10%であるのに対し、僅か4%であるにすぎない。

10

【0035】

したがって、本発明の特定の目的は、生物学的サンプル中の全アポCIII、またはアポBおよび非アポB含有リポ粒子内のアポCIIIを測定する方法であって、サンプル（またはその希釈物）を上記の抗体（そのフラグメントまたは誘導体を包含する）に、代表的には様々な希釈濃度にて接触させ、アポCIII-抗体免疫複合体の形成を比濁分析アッセイによって評価する工程を含む方法にある。より好ましくは、免疫グロブリン以外のタンパク質を除去し、及び/または抗体を濃縮するために、抗体をサンプルに接触させる前に処理に付す。この処理は、代表的には、たとえばRitchieら[31]に記載されたとおり、抗体をポリエチレングリコール（PEG）に接触させる工程を含む。代表的には、0.5~1 µgの特異的な抗体をアッセイに用いるが、当業者は、本発明から逸脱することなしに、異なる量を用い得る。

20

【0036】

比濁分析アッセイでは、ポリクローナル抗体を用いるのが一般的である。

【0037】

この方法は、血漿、血清、間質液、培養細胞の上清等々を包含する、様々な生物学的サンプルに対して実施することができる。サンプルは、対象（たとえばヒトである対象）から採取し、直接アッセイに用いてよい。または、サンプルを後で試験するために希釈し、及び/または（たとえば凍結状態に）保存してもよい。

30

【0038】

この方法は、可溶性アポCIIIまたはアポCIII含有リポ粒子の検出に適用することができる。上記に示したとおり、アポCIIIは、高密度リポタンパク質（HDL）、低密度リポタンパク質（LDL）、超低密度リポタンパク質（VLDL）、キロミクロン等々のような、様々なリポ粒子に含まれている。これらのリポ粒子のいくつかは、じゅく腫形成性であり、サンプル中のその（相対）量は、対象の病理学的状態と相関する。特に、アポリポタンパク質Bをさらに含有する、アポCIII含有リポ粒子は、極めてじゅく腫形成性に富むことが公知である[ Franck Sacks, Zouherを参照 ]。因みに、アポCIII L p B / アポCIII L p 非Bの比は、対象におけるアテローム性動脈硬化の開始、発症または進行の指標となる。本発明によれば、抗合成アポCIII抗体を用いたアポCIII含有リポ粒子の、高い効率、信頼度および処理量での大量測定が可能となる。

40

【0039】

より詳しくは、本発明は、サンプル中のじゅく腫形成性のアポCIII L p Bを検出するのに用いることができる。特定の実施態様では、この方法は、

(a) サンプル中の全アポCIIIの量を決定する工程と、

(b) サンプルからのアポB含有リポ粒子を除去する工程と、

(c) サンプル中の非アポB含有リポ粒子内のアポCIIIの量を決定する工程とを含む。

50

## 【0040】

減算によって、(a)および(c)で得られた量より、サンプル中の、最もじゅく腫形成性に富むアポB含有リポ粒子内のアポCIIIの量が決定できる。工程(b)でのアポB含有リポ粒子の除去は、該サンプルの一部を免疫沈降性抗アポB抗体による処理によって実施することができる。

## 【0041】

検出アッセイは、様々な実験的、臨床的及び/または診断の条件に用いることができる。

## 【0042】

特に、この方法は、脂質代謝障害の発症の危険性がある、個体の素因を検出するのに用いることができる。本発明の特定の目的は、脂質代謝障害の素因、またはその発症の危険性がある個体を検出する方法であって、対象からのサンプル中のアポBおよび非アポB含有リポ粒子内のアポCIIIを、上記に定義された抗体(そのフラグメントもしくは誘導体を包含する)を用いてin vitroで測定する工程を含み、ここで、アポCIII、またはアポB含有リポ粒子内のアポCIIIのレベルの上昇(正常な対象の平均値との比較において)が脂質代謝障害の発症の危険性がある個体の指標となる。代表的には、アポB含有リポ粒子内のアポCIIIの有意な生理病理学的レベルは、正常平均値を少なくとも20%、好ましくは少なくとも50%を越えて上昇している。

10

## 【0043】

本発明のもう一つの目的は、対象におけるトリグリセリドに富むリポタンパク質の肝取込みをモニターする方法であって、サンプル中のアポCIII、またはアポCIII含有リポ粒子のレベルを、上記に定義された抗体(そのフラグメントまたは誘導体を包含する)を用いてin vitroで検出する工程を含む方法である。

20

## 【0044】

本発明のもう一つの目的は、対象における脂質代謝関連障害治療の効果をモニターする方法であって、該治療を該対象に施した後に、該対象からのサンプル中のアポCIII、またはアポBおよび非アポB含有リポ粒子内のアポCIIIのレベルを、上記に定義された抗体(そのフラグメントまたは誘導体を包含する)を用いてin vitroで検出する工程を含む方法である。典型的には、治療の効果は、対象におけるアポCIIIレベルと相関する。効果は、対象におけるアポCIII、またはアポBおよび非アポB含有リポ粒子内のアポCIIIのレベルもしくは活性をその治療により調節できるか、あるいは正常なアポCIII、またはアポBおよび非アポB含有リポ粒子内のアポCIIIのレベルを回復できるかに相関する。

30

## 【0045】

本発明のさらに一つの目的は、対象の生理学的状態をその脂質代謝レベルで評価する方法であって、該対象からのサンプル中のアポBおよびアポ非B含有リポ粒子内のアポCIIIのレベルを、上記に定義された抗体(そのフラグメントまたは誘導体を包含する)を用いてin vitroで検出する工程を含む方法である。

## 【0046】

抗体は、血清中の全アポCIII、ならびにアポBおよび非アポB含有リポ粒子内のアポCIIIの濃度を調整する化合物または食餌をスクリーニングするために用いることもできる。代表的には、この方法は、化合物を投与するか、または動物もしくは患者を食餌に付し、該動物または患者からの生物学的サンプルを採取し、該サンプル中の全アポCIII、ならびにアポBおよび非アポB含有リポ粒子内のアポCIIIのレベルを、上記に定義された抗体(そのフラグメントまたは誘導体を包含する)を用いて検出もしくは用量を測定する工程を含む。

40

## 【0047】

上記に示したとおり、これらの方法は、様々なサンプル(代表的には血漿または血清)に対して実施することができる。ELISA、RIE、EIA等々によって、最も好ましくは比濁分析アッセイによって実施することができる。

## 【0048】

本発明は、上記のポリペプチドまたは抗体を含むキットにも関するものである。該キット

50

は、いかなるサンプル中のアポBおよび非アポB含有リポ粒子内のアポCIIIを検出または定量するのに用いることもできる。最も好適なキットは、上記に定義された抗体と、免疫反応、特に抗体-抗原複合体形成を実施または検出（または定量）するための試薬とを含む。試薬は、標識、緩衝液、基質等々を包含する。該キットは、代表的には、異なる試薬および生成物のための容器を含み、さらに、アッセイを実施するのに適した支持体その他の装置を含んでよい。

【0049】

本発明のそれ以外の側面および利点は、下記の実施例中に開示されることになるが、当該実施例は例示であり、かつ本願の対象範囲を限定するものではない。

【実施例】

10

【0050】

#### 1. アポCIIIの合成

固相法 [ 26 ] によって、自動化合成装置モデルABI431A (Applied Biosystems Inc.) にて、0.5 mmolのPAM-Ala樹脂上でBoc/Bzl法によりポリペプチドを合成した。アミノ酸を、それぞれ、ジシクロヘキシルカルボジイミド/ヒドロキシベンゾトリアゾールによって、カップリングすることなく、二回カップリングさせた。未精製生成物を、0~100%の緩衝液B (緩衝液A: H<sub>2</sub>O中0.05%のTFA、および緩衝液B: H<sub>2</sub>O中0.05%のTFA、60%のCH<sub>3</sub>CN) の線形勾配を用いる、Vydac C18カラム上での逆相HPLCによって精製かつ分析した。分子質量は、イオンスプレー (ネブライザー支援エレクトロスプレー) 源 (Sciex, Toronto, カナダ国) を装備した、単純四極イオンエレクトロスプレー質量分析計のAPI (Perkin-Elmer) を用いて決定した。アミノ酸分析は、0.25%フェノールを含有する6N HClによる、110で24時間の加水分解後に、Beckman 6300アミノ酸分析装置 (Beckman instruments, Fullerton, CA) を用いて実施した。

20

【0051】

#### 2. 免疫感作

基本的には前記のとおり [ 27 ]、抗アポCIII血清をウサギで調製した。ペプチドを、完全フロイントアジュバント中で乳化し、初め2回の注射については1回あたり0.5 mgのペプチドをウサギに皮下注射し、次いで15日の間隔をあげ、ペプチド0.25 mgのみを用いた以外は上記と同じアジュバントを用いて追加免疫を行った。

30

【0052】

#### 3. 抗アポCIII免疫グロブリン (IgG) の単離

Ritchieら [ 31 ] のプロトコルを修正し、IgGを調製した。非免疫グロブリンタンパク質を免疫血清から除去し、IgGを透析し、濃縮した。

【0053】

#### 4. 抗体の特異性

VLDL、LDLおよびHDLの分析イムノプロットングを実施して、アポCIII抗体の特異性を評価した。図1に示したとおり、リポタンパク質のすべての下位分類群のその他のタンパク質との交差反応は、全く観察されず、抗体の高い特異性が立証された。

【0054】

40

#### 5. VLDLおよびHDLリポ粒子内のアポCIIIに対する、抗体の親和度

この実験では、本発明者らは、アポCIII LpB、およびアポCIII Lp非B粒子の測定における、イムノアッセイの有効性を確認するために、抗合成アポCIII抗体が、VLDLおよびHDL中のアポCIIIを同じ親和度で測定できるか否かを決定した。結果を図2に提示する。血漿、VLDLおよびHDLの平行な曲線は、これらのリポタンパク質下位分類群のすべてにおいて、抗合成アポCIII抗体がアポCIIIを正確に認識していることを立証している。さらに、その有利な特性および製造条件に加えて、対照実験は、本発明の抗合成アポCIII抗体が、少なくとも従来抗体と同程度に優れた親和度を有することを示した。

【0055】

50

## 6. 免疫比濁分析アッセイ :

試薬および材料

【0056】

【表2】

表 1

	設定	備考
抗アポCIII IgG	1 x 6.5 ml (300 tests)	研究室ロット
抗アポB免疫グロブリン	1 x 5 ml (100tests)	研究室ロット
希釈剤1	4 x 120 ml (4 x 330 tests)	Beckman Coulter 部品番号447640
希釈剤2	4 x 120 ml (4 x 330 tests)	Beckman Coulter 部品番号447660
緩衝液1	4 x 120 ml (4 x 330 tests)	Beckman Coulter 部品番号447650
IMAGE UDR カートリッジ	10 (10 x 300 tests)	Beckman Coulter 部品番号447250
マイクロ管	1000	Beckman Coulter 部品番号448162

10

20

【0057】

抗アポCIII免疫グロブリン :

上記の実施例2および3で生成された抗アポCIII IgGは、直ちに使用できる。これらを、その週に用いるために2~8℃で冷蔵するか、または数ヶ月先まで用いるために-20℃に凍結することができる。免疫グロブリンは、アジ化ナトリウムを含有する。

30

【0058】

抗アポB免疫グロブリン :

抗アポリポタンパク質BのIgGは、様々な入手源から得るか、または実施例2および3に記載したとおりに生成することができる。その週に用いるために2~8℃で冷蔵するか、または数ヶ月先まで用いるために-20℃に凍結することができる。免疫グロブリンは、アジ化ナトリウムを含有する。

【0059】

標準 :

アポCIII標準は、電気免疫拡散アッセイで校正したヒト血清プールであり、HIVおよび肝炎ウイルスについて試験し、汚染を防ぐための通常の予防措置に従って取り扱った。標準アポCIIIのレベルは2.5 mg/dlであった。校正曲線を校正するために、標準を、表2に示したとおりに希釈した。

40

【0060】

【表3】

表 2

測定点	希釈剤2 ( $\mu$ l)	標準 ( $\mu$ l)	濃度 ( $\mu$ g/ml)
1	175	25	0,3125
2	165	35	0,4375
3	150	50	0,6250
4	140	60	0,7500
5	130	70	0,8750
6	120	80	1,000
7	100	100	1,250
8	60	140	1,750
9	0	200	2,500

10

## 【0061】

サンプルの調製：

分析には、採取直後か、または凍結した（-80）サンプルが推奨される。血清は、臨床研究室の試験の際の確立された手順に従って採取した。必要ならば、サンプルを、より長い貯蔵期間にわたって凍結して保つことができる；凍結サンプルは、1年間まで安定である。使用の前に、サンプルを希釈剤1にて3倍に希釈する。

20

## 【0062】

アポB粒子を含まないサンプルの調製：

試験管内で、以下の順序で：抗アポB 40  $\mu$ l、血清 40  $\mu$ l、および 40  $\mu$ lのBeckman希釈剤1を加える。混合物を攪拌し、室温で10分間温置し、3,500 rpmで10分間遠心分離した。分析用に、上清を採取した。アポBを含まないサンプルの最終濃度を、上清の3倍希釈のために、補正した。

30

## 【0063】

プロトコル：

- ・IMMAGE免疫化学システムオペレーションマニュアルに従って、下記に列挙したパラメーターでユーザー定義の試薬をプログラミングする。
- ・抗体試薬を、新たなユーザー定義カートリッジのA区画に移す。
- ・緩衝液1をこのカートリッジのB区画に移す。
- ・表2に示した希釈計画に従って、標準からの値（実際の標準アポC III値は、2.5 mg/dlであった）をパラメーター表に記入する。
- ・希釈剤2をサンプル希釈剤として用いる。

## 【0064】

40

【表4】

要約：

化学名	アポCIII	単位	mg/dl
ロット番号	カートリッジを参照	プロトコル	非競合比濁分析
試薬系統	カートリッジを参照	試薬期限	使用者が定義
サンプルまたは希釈の体積	20 $\mu$ l	利得	3
試薬緩衝液の体積	0 $\mu$ l	校正希釈	1 / 5
区画の体積	20 $\mu$ l	サンプルの希釈	1 / 20*
			1 / 5**
区画の体積	200 $\mu$ l	反応時間	2分

\* 校正の承認後に設定する。

\*\* アポCIII Lp非Bの測定に対して設定する。

10

40

50

## 【0065】

結果：

結果を図3に提示する。実施範囲の0.3 ~ 2.5  $\mu$ g/mlにおいて、非常に狭い変動係数を示す。得られた参照値は、全アポCIII：1.6 ~ 4.5 mg/dl、アポCIII Lp非B：0.5 ~ 3.5 mg/dl、アポCIII LpB：< 2.3 mg/dlであった。

20

## 【0066】

7. アポCIII比濁分析アッセイとアポCIII電気免疫拡散アッセイとの比較

本発明の比濁分析アッセイの特性および性能を、電気免疫拡散アッセイで得られたそれと比較した[32]。結果を下記の表3に報告するが、それは、本発明の比濁分析アッセイの利点を示している。

## 【0067】

【表5】

表 3

	比濁分析アッセイ		電気免疫拡散	
	全アポCIII	アポCIII Lp非B	全アポCIII	アポCIII Lp非B
CV(%)	2	4,2	9,7	7,7
回収(%)	101	105	103	ND*
感度(mg/dl)	0,06		0,09	
遅延時間 (20サンプルについて)	90分		1日	

\* 決定せず

## 【0068】

8. 相関研究

LpCIIIのSEBIAキットを用いて電気免疫拡散について分析した、20の血清サンプルを、その後、IMMAGE法を用いて分析した。結果を図4に示すが、それは、本発明の抗体を用いた比濁分析アッセイの高い相関および精度を立証している。

## 【0069】

## 9. 本発明のその他の利点

本発明の合成アポCIIIポリペプチドのその他の利点および使用は、下記を包含する：

- すべてのアポCIIIアッセイ（ELISA、RIA、電気免疫拡散等々）の較正のための標準としての使用；
- LpL活性（この酵素は、トリグリセリドに富むリポタンパク質の脂質分解に關与する）の阻害、またはLDL受容体によるアポB含有リポタンパク質の取込みの阻害のような、リポタンパク質の代謝経路の研究における使用。

## 【0070】

本発明の抗体のその他の利点および使用は、下記を包含する：

- アポCIIIを定量するためのすべてのイムノアッセイにおける使用；
- アポCIIIの検出（イムノプロットティング、ドットプロットティング、免疫組織化学および免疫細胞化学）における使用；
- タンパク質を精製するための免疫親和性および免疫沈降法における使用。

## 【0071】

## 【表6】

## 参考文献

1. Hoddis, H.N., and Mack W.J., *Triglyceride-rich lipoproteins and the progression of coronary artery disease*. *Curr. Opin. Lipidol.*, 1995. 6: p. 209-214.
2. Brewer, H.B., Shulman R., Herbert P., Roman R. and Werryly K., *The complete amino acids sequence of alanine apolipoprotein from plasma very low density lipoproteins*. *J. Biol. Chem.*, 1974. 249: p. 4975-4984.
3. Lenich, C., Brecher P., Makrides S., Chobanian A. and Zannis V.I., *Apolipoprotein gene expression in rabbit: abundance, size and distribution of apolipoprotein mRNA species in different tissues*. *J. Lip. Res.*, 1988. 29: p. 755-764. 10
4. Ito, Y., Breslow J.L., Chait B.T., *Apolipoprotein C-III0 lacks carbohydrate residues: use of mass spectrometry to study apolipoprotein structure*. *J Lipid Res*, 1989. 30: p. 1781-1787.
5. Assman, G., and Ulenbruck G., *Characterization of oligosaccharide side chain of apolipoprotein CIII from human VLDL plasma*. *Biochimica and Biophysica Acta.*, 1989. 541: p. 234-240.
6. Pullinger, C.R., Malloy M.J., Shahidi A.K., Ghassemzadeh M., Duchateau P., Villagomez J., Allaart J. and Kane J.P., *A novel apolipoprotein C-III variant, apoC-III(Gln38-->Lys), associated with moderate hypertriglyceridemia in a large kindred of Mexican origin*. *J Lipid Res*, 1997. 38: p. 1833-1840. 20
7. von Eckardstein, A., Holz H., Sandkamp M., Weng W., Funke H., Assmann G., *Identification of an apolipoprotein C-III variant in a family with hyperalphalipoproteinemia*. *J Clin Invest*, 1991. 87: p. 1724-1731.
8. Roghani, A., and Zannis V.I., *Mutagenesis of the glycosylation site of human Apo CIII. O-linked glycosylation is not required for Apo CIII secretion and lipid binding*. *J Biol Chem*, 1988. 263: p. 17925-17932.
9. Schonfeld, G., George P. K., Miller J., Reilly P. and Witztum J., *Apolipoprotein C-II and C-III levels in hyperlipoproteinemia*. *Metabolism*, 1979. 28(10): p. 1001-10.
10. Kashyap, M.L., Srivastava L. S., Hynd B. A., Gartside P. S. and Perisutti G., *Quantitation of human apolipoprotein C-III and its subspecies by radioimmunoassay and analytical isoelectric focusing: abnormal plasma triglyceride-rich lipoprotein apolipoprotein C-III subspecies concentrations in hypertriglyceridemia*. *J Lipid Res*, 1981. 22: p. 800-810. 30
11. Shelburne, F., Hanks J., Meyers W. and Quardfordt S.A., *Effect of apolipoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat*. *J. Clin. Inves.*, 1980. 65: p. 652-658.
12. Windler, E., and Havel R.J., *Inhibitory effect of C apolipoproteins from rats and human on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnant by the perfused rat liver*. *J. Lip. Res.*, 1985. 26: p. 556-563.
13. Brown, V., and Bakinsky M.L., *Inhibition of lipoprotein lipase by an apolipoprotein of human very low density lipoproteins*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1972. 46: p. 375-382. 40
14. Krauss, R.M., Herbert P.N., Levy R.I. and Fredrickson D.S., *Further observations on the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins*. *Circ. Res.*, 1973. 33: p. 403-411.

15. Wang, C.S., Mc Conathy W.J., Kloer H.U. and Alaupovic P., *Modulation of lipoprotein lipase activity. The effect of apolipoprotein CIII*. J. Clin. Inves., 1985. **75**: p. 384-390.
16. Mc Conathy, W.J., Gesquiere J.C., Mass H., Tartar A., Fruchart J.C. and Wang C.S., *Inhibition of lipoprotein lipase activity by synthetic peptides of apo CIII*. J. Lip. Res., 1972. **33**: p. 995-1003.
17. Kinnemen, P.K.J., and Enholm C., *Effect of serum and C apoproteins from VLDL on post-heparin plasma hepatic activity*. FEBS, 1976. **65**: p. 354-357.
18. Blankenhorn, D.H., Alaupovic P, Wickham E., Chin H.P. and Azen S.P., *Prediction of angiographic change in native human coronary bypass grafts lipid and non lipid factors*. Circulation., 1990. **81**: p. 470-476. 10
19. Hoddis, H.N., Mack W.J., Azen S.P., Alaupovic P., Pogogla J.M., Labree L., Hemphill L.C., Kramsch D.M. and Blackerhorn D.H., *Triglyceride and cholesterol rich lipoproteins have differential effect on mild/moderate and severe lesion progression as assessed by quantitative coronary angiography in controlled trial lovastatin*. Circulation., 1994. **90**: p. 42-49.
20. Koren, E., Corder C., Mueller G., Centurion H., Hallum G., Fesmire J., Mc Conathy W.J. and Alaupovic P., *Triglyceride-rich lipoprotein lipoparticles correlate with severity of coronary disease*. Atherosclerosis, 1996. **122**: p. 105-115.
21. Aalto-Setälä, K., Fisher E.A., Chen X., Chajek-Shaul T., Hayek T., Zechner R., Walsh A., Ramakrishnan R., Ginsberg H.N. and Breslow J.L., *Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles*. J Clin Invest, 1992. **90**: p. 1889-1900. 20
22. Harrold, H.J., Van Barlinger J., Harmen de J., Erklens W.D. and Tjerk W.A de Bruin., *Lipoprotein lipase enhanced binding of human triglyceride rich lipoproteins to heparan sulfate : Modulation by apolipoprotein E and apolipoprotein C*. J. Lip. Res., 1996. **37**: p. 754-760.
23. Yang, C.Y., Gu Z.W., Valentinova N., Pownall H.J., Lee B., Yang M., Xie Y.H., Guyton J.R., Vlasik T.N., Fruchart J.C., and Gotto A.M., *Human very low density lipoprotein structure: interaction of the C apolipoproteins with apolipoprotein B-100*. J Lipid Res, 1993. **34**: p. 1311-1321. 30
24. Clavey, V., Lestavel-Delattre S., Copin C., Bard J.M. and Fruchart J.C., *Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII and E*. Arth. Thromb. And Vasc. Biol., 1995. **15**: p. 963-971.
25. Blankenhorn, D.H., Alaupovic P., Wickham E., Chin H.P. and Azen S.P., *Prediction of angiographic change in native human coronary arteries and aortocoronary bypass grafts. Lipid and nonlipid factors*. Circulation., 1990. **81**: p. 470-476.
26. Holmquist, L., *Quantitation of human serum very low density apolipoproteins C-I, C-II, C-III and E by enzyme immunoassay*. J Immunol Methods, 1980. **34**(3): p. 243-51. 40
27. Curry, M.D., McConathy W. J., Fesmire J. D. and Alaupovic P., *Quantitative determination of human apolipoprotein C-III by electroimmunoassay*. Biochim Biophys Acta, 1980. **617**(3): p. 503-13.

28. Merrifield, R.B., *Solide phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide.* J. Am. Chem. Soc, 1963. **85**: p. 2149-2154.

29. Vaitukaitis, J., et al., *A method for producing specific antisera with small doses of immunogen.* J Clin Endocrinol Metab, 1971. **33**(6): p. 988-91.

30. Bassiri, R.M., Dvorak J. and Utiger R.D., *Thyrotropin-releasing hormone*, in *Methods of hormone radioimmunoassay*, B.M. In: Jaffe, and Behrman H.R. (Eds), Editor. 1979, New York Academic Press: New York. p. p: 46.

31. Ritchie, R.F., and J. Stevens, *Qualifications for acceptable anti-serum performance in the automated immunoprecipitation system: A brief review of commercially available reagents*, in *advances in Automated Analysis, Technicon Symposia.* 1972, Mediad Inc: Tarry-town, NY. p. 9-14.

32. Luc, G., Fievet C., Arveiler D., Evans A.E., Bard J.M., Combien F, Fruchart J.C. and Ducimetiere P., *Apolipoproteins CIII and E in apo B and non apo B containing lipoproteins in two populations at contrasting risk for myocardial infarction: the ECTIM study.* J. Lipid. Res., 1996. **37**: p. 508-517.

10

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 7 2 】

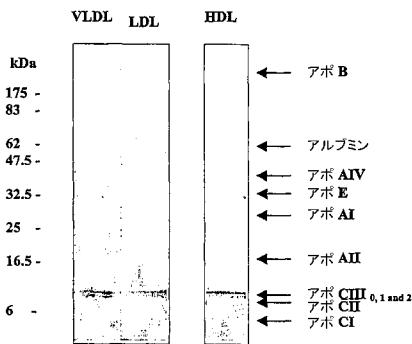
【 図 1 】 抗体の特異性を示す図である。

【 図 2 】 VLDL および HDL に対する抗体の親和性を示す図である。

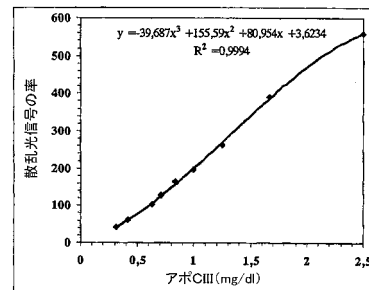
【 図 3 】 アポ C III の比濁分析アッセイの較正曲線を示すグラフである。

【 図 4 】 相関研究の結果を示すグラフである。

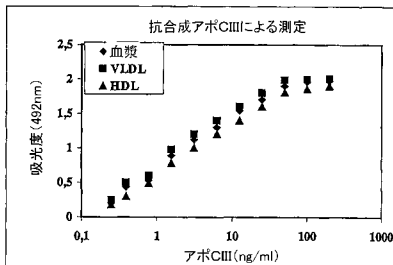
【 図 1 】



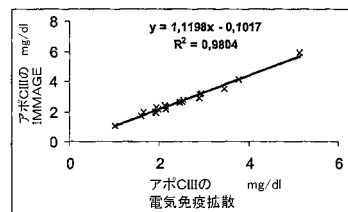
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】



## 【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
12 December 2002 (12.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/098919 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/775
- (21) International Application Number: PCT/EP02/06110
- (22) International Filing Date: 4 June 2002 (04.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
01401445.0 5 June 2001 (05.06.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): GENFIT  
[FR/FR], Parc Eurasanté, Lille Métropole, 885, rue Eugène  
Aviné, F-59120 Loos (FR).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): NAJIB-  
FRUCHARI, Jamila [FR/FR]; 185, rue Clémenceau,  
F-59211 Sames (FR). MAJD, Zouher [MA/FR]; 89, rue  
des Chrysanthèmes, F-59700 Marc en Baroeel (FR).
- (74) Agents: BECKER, Philippe et al.; Becker et Associés,  
35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).
- (81) Designated States (national): AI, 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, GI,  
GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE,  
SG, SI, SK, SL, TH, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).
- Declaration under Rule 4.17:  
of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- Published:  
— without international search report and to be republished  
upon receipt of that report
- 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 02/098919 A2

(54) Title: NEW METHOD FOR APO CIII MEASUREMENT IN APO B AND NON APO B CONTAINING PARTICLES

(57) Abstract: The present invention relates to a new method for measuring apolipoprotein CIII ("apo CIII") in apo B and non apo B containing lipoparticles. This invention also relates to synthetic apo CIII products, corresponding antibodies, kits comprising the same, and their use to detect, quantify and/or monitor apo CIII levels in a sample, as well as to quantify and/or monitor atherogenic lipoparticle levels in a sample. The above compounds and kits can also be used to modulate apo CIII levels or activity *in vitro* or *in vivo*, and to regulate lipid metabolism in a subject.

WO 02/098919

PCT/EP02/06110

1

**New method for apo CIII measurement in apo B and non apo B containing particles**

The present invention relates to a method for the detection and  
5 quantification of apolipoprotein CIII ("apo CIII"). This invention also relates to  
synthetic apo CIII products, corresponding antibodies, kits comprising the same,  
and their use to detect, quantify and/or monitor apo CIII levels in a sample, as  
well as to quantify and/or monitor atherogenic lipoparticle levels in a sample. The  
above compounds and kits can also be used to modulate apo CIII levels or  
10 activity *in vitro* or *in vivo*, and to regulate lipid metabolism in a subject.

Increasing evidence suggest that apo CIII plays an important role in  
controlling plasma triglyceride metabolism and in determining plasma  
concentration of potentially atherogenic triglyceride-rich lipoproteins (TRL) [1].  
15 Apo CIII, a 79 amino acids protein synthesised by the liver and the intestine [2],  
is a component of chylomicrons, very low density lipoproteins (VLDL) and high  
density lipoproteins (HDL) [3].

Apo CIII exists as three isoforms : apo CIII<sub>0</sub>, apo CIII<sub>1</sub> and apo CIII<sub>2</sub>. Apo  
CIII<sub>0</sub> is not glycosylated, however apo CIII<sub>1</sub> and apo CIII<sub>2</sub> are glycosylated and  
20 have respectively one and two sialic acid residues [4]. The sugar moiety consists  
of disaccharide  $\beta$ -D galactosyl [1-3]  $\alpha$ -N-Acetyl-D-Galactosamine attached to  
threonine 74 of protein chain by O-glycosidic binding [5]. In human  
normolipidemic plasma apo CIII<sub>0</sub>, apo CIII<sub>1</sub> and apo CIII<sub>2</sub> represent 14%, 59%  
and 27% of total apo CIII, respectively. While several variants of apo CIII are  
25 associated with moderate hyperlipidemia [6, 7], mutagenesis of the glycosylation  
site of human apo CIII does not affect its secretion and lipid binding [8].

Plasma concentration of apo CIII is positively correlated with levels of  
plasma triglycerides [9, 10]. Liver perfusion studies demonstrate that apo CIII  
30 inhibits the hepatic uptake of TRL and their remnants [11, 12], whereas *in vitro*

CONFIRMATION COPY

WO 02/098919

PCT/EP02/06110

2

experiments show that apo CIII inhibits the activity of both lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase [13-17]. Apo CIII, therefore modulates the plasma catabolism and clearance of TRL. This is of pathophysiological significance as indicated by angiographic studies showing that plasma lipoprotein distribution of apo CIII is a statistically significant independent predictor of the progression or severity of coronary artery diseases (CAD) [18-20]. The role of apo CIII in plasma TRL metabolism has been more defined by the results of recent studies in transgenic animals [21]. Plasma accumulation of TRL in mice overexpressing apo CIII has been shown to be associated with reduced plasma VLDL and chylomicrons remnants clearance, apparently due to reduced binding of TRL to LDL receptor [22] and to heparan sulfate proteoglycans [23]. Also the inhibitory effect of apolipoproteins C on the LDL receptor of apo B-containing lipoproteins was demonstrated [24]. Decreased receptor binding was reversed by addition of exogenous apolipoprotein E. Immunological and cryo-electron microscopy studies have indicated that apo CIII masked some apo B100 epitopes and modified its conformation [23]. Furthermore, the ratio of apo CIII lipoparticles devoid of apolipoprotein B (apo CIII Lp non B) and of apo CIII lipoparticles containing apolipoprotein B (apo CIII LpB) is closely connected to the lipolytic activity and stabilization or decline of atherosclerotic plaque [25].

These data thus show that plasma levels of apo CIII can be correlated to various pathophysiological conditions involved in the atherosclerosis susceptibility and the predisposition to CAD. It is thus clearly apparent that the availability of compounds, methods and kits to detect, quantify or modulate Apo CIII levels would be of significant value in the therapeutic, diagnostic, screening and/or experimental areas.

Previous processes have been described in the art to detect apo CIII, based on immunological methods. In particular, Kashyap *et al.* [10] relates to a radio-immuno-assay (RIA) for measurement of apo CIII. However, the reported method is expensive and requires radioisotope handling. Holmquist [26] discloses an

WO 02/098919

PCT/EP02/06110

3

Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) to quantify Apo CIII. However, this assay is a low precision test, requires antibody purification by immuno-affinity and its labelling. In addition pure apo CIII or VLDL lipoparticles are needed, when competition ELISA are used. It has also a low throughput. Curry *et al.* [27] reported an Electroimmunoassay method (EIA). However, large amounts of polyclonal antibodies are needed, the assay is of low throughput, and delipidation of lipemic samples may be necessary for accurate determination. It is also not as sensitive as the other methods.

10 In addition to the above drawbacks of prior art techniques, another important and difficult aspect of previous apo CIII immuno-assay is the preparation of antigen. Indeed, native apo CIII must be isolated from pooled human plasma. Ideal patients for such collections are patients with severe endogenous hypertriglyceridemia with fasting chylomicronemia (type V  
15 lipoprotein phenotype). Such patients are not always available, and even if the apo CIII purification is performed with this hypertriglyceridemic plasma, only few mg of this protein can be obtained. Furthermore, for the purification of native apo CIII, anhydrous solvents must be used for delipidation step because the C proteins are slightly soluble in a "wet" organic phase. This decreases recovery of  
20 apolipoproteins and invalidates any quantitative information. The procedure of delipidation can also lead to the formation of peroxide that generates artefacts in purified apolipoproteins. Another difficult aspect of the apo CIII preparation from native plasma is to obtain this protein with high purity, since the other apo C proteins (apo CI and apo CII) and apo AII have some identical physicochemical  
25 characteristics with apo CIII.

The present invention now provides a novel strategy to produce apo CIII and a new method to detect and to quantify this apolipoprotein. The present invention specifically discloses novel methods of producing efficient anti-apo  
30 CIII antibodies using total synthetic apo CIII. The invention also discloses such

WO 02/098919

PCT/EP02/06110

4

efficient antibodies, kits comprising the same, and their use to detect, quantify, purify and/or monitor total apo CIII levels or apo CIII in atherogenic or non atherogenic lipoparticles (LpB and Lp non B) in serum or plasma.

5 A particular object of this invention relates to a substantially pure, synthetic apo CIII polypeptide having the sequence of SEQ ID NO: 1, or an immunogenic fragment or derivative thereof.

A further object of this invention is a method of producing anti-apo CIII antibodies comprising an immunization step with a synthetic apo CIII polypeptide as defined above. This invention also encompasses antibodies prepared according to this method, as well as, more generally, antibodies that bind a polypeptide as defined above, as well as fragments or derivatives of such antibody.

10 An other aspect of this invention is a method of detecting or dosing total apo CIII or apo CIII in apo B or non apo B containing lipoparticles in plasma or serum sample with an antibody (including a fragment or derivative thereof) as defined above.

20 An other object of this invention is a method of detecting predisposition or individuals at risk of developing lipid-metabolism disorders, comprising detecting in vitro total apo CIII or apo CIII in apo B or non apo B containing lipoparticles in a sample from a subject with an antibody (including a fragment or derivative thereof) as defined above.

25 An other object of this invention is a method of monitoring hepatic uptake of triglyceride-rich lipoprotein in a subject, comprising detecting in vitro apo CIII-containing particles in a sample using an antibody (including a fragment or derivative thereof) as defined above.

30 An other object of this application is a method of detecting or monitoring the formation, development or progression of atherosclerosis in a subject, comprising detecting in vitro, in a sample from said subject, the level of apo CIII

WO 02/098919

PCT/EP02/06110

5

or apo CIII-containing atherogenic particles using an antibody (including a fragment or derivative thereof) as defined above effective. The subject is preferably a mammal, particularly a human, more preferably a subject at risk of developing lipid-disorders such as CAD or a subject having such a disease.

5

As indicated above, this invention discloses a substantially pure, synthetic apo CIII polypeptide having the sequence of SEQ ID NO: 1, or an immunogenic fragment or derivative thereof. The term "substantially pure" indicates that the polypeptide is essentially devoid of other side products that occur during apoCIII synthesis, particularly of other apolipoproteins, such as apo CI, apo CII, apo B and apo AII. The term "synthetic" indicates that the polypeptide is not a naturally-occurring molecule, but has been prepared by a synthesis using chemical processes, as described in the examples. In this regard, the synthetic polypeptide of this invention is essentially unglycosylated.

10

The instant invention now shows that synthetic apo CIII can be produced and used to generate antibodies. The invention further shows that such antibodies are able to specifically bind naturally-occurring apo CIII, whether as a soluble antigen or included in lipoparticles. The invention shows that such antibodies can bind to the various isoforms of apo CIII, and have immuno-precipitating properties. These synthetic polypeptides and corresponding antibodies thus represent novel advantageous products to detect and quantify apo CIII.

15

20

More particularly, the synthetic polypeptide of this invention comprises SEQ ID NO:1, as described below:

25

SEQ ID NO: 1 : Ser-Glu-Ala-Glu-Asp-Ala-Ser-Leu-Leu-Ser-Phe-Met-Gln-Gly-Tyr-Met-Lys-His-Ala-Thr-Lys-Thr-Ala-Lys-Asp-Ala-Leu-Ser-Ser-Val-Gln-Glu-Ser-Gln-Val-Ala-Gln-Gln-Ala-Arg-Gly-Trp-Val-Thr-Asp-Gly-Phe-Ser-Ser-Leu-Lys-Asp-Tyr-Trp-Ser-Thr-Val-Lys-Asp-Lys-Phe-Ser-Glu-Phe-Trp-Asp-Leu-Asp-Pro-Glu-Val-Arg-Pro-Thr-Ser-Ala-Val-Ala-Ala

30

WO 02/098919

PCT/EP02/06110

6

As illustrated in the examples, this polypeptide can be prepared advantageously by solid phase synthesis, particularly using a Boc/Bzl strategy [28]. When this strategy of synthetic apo CIII is used, the production is 10 to 100 fold faster and leads to a much higher purity than prior art techniques.

The term "derivative" includes polypeptide comprising one or several mutation, substitution, deletion and/or addition of one or several amino acid residues and retaining substantially the same antigenic specificity. Typical examples of derivatives include sequence variations due to apo CIII polymorphism, splicing, etc. Most preferred derivatives contain 5 modified amino acid residues at most, as compared to SEQ ID NO: 1. Additional residues may correspond to carrier or linker residues, protecting groups, etc. Furthermore, the polypeptide may be modified, for instance by chemical, physical and/or enzymatic modification, to enhance its stability, increase its immunogenicity, incorporate a label or a tracer, etc. Examples of such modifications include addition of a tag (e.g., myc), a label (e.g., radiolabel, enzymatic label, etc.), a glycosylation, etc.

The polypeptides may be soluble, purified or complexed with a carrier molecule, such as KLH or serum-albumin, for instance, or any other inert (e.g., synthetic) molecule, including a bead, etc. In a particular embodiment, the polypeptides are coupled to a carrier, especially for use in antibody production. Coupling can be performed according to conventional techniques [29, 30].

The polypeptides may also be conjugated or fused to any heterologous polypeptide molecule, such as a biologically active molecule, for instance. Heterologous designates any polypeptide which does not originate from a human apo CIII molecule.

A specific embodiment of this invention is a composition comprising a synthetic polypeptide consisting of SEQ ID NO: 1 and devoid of other apolipoproteins.

WO 02/098919

PCT/EP02/06110

7

The polypeptides may be used in screening assays, or in titration assays, as controls, standards or to calibrate the assays. They may also be used to modulate some enzymes activities (lipoprotein lipase and hepatic lipase). They are also particularly suited to produce anti-apo CIII antibodies.

In this regard, a further object of this invention resides in an antibody that binds a polypeptide as defined above. Obviously, binding should be specific, meaning that the antibody should not bind specifically to other antigens, and that the binding to other antigens can be discriminated from specific binding to the above apoCIII peptide. As illustrated in the examples, preferred antibodies of this invention do not bind specifically to distinct lipoproteins. The antibody may be a polyclonal or a monoclonal antibody. Furthermore, the term antibody also includes fragments and derivatives thereof, in particular fragments and derivatives of said monoclonal or polyclonal antibodies having substantially the same antigenic specificity. These include antibody fragments (e.g., Fab, Fab<sup>2</sup>, CDRs, etc), humanized antibodies, poly-functional antibodies, Single Chain antibodies (ScFv), etc. These may be produced according to conventional methods, including immunization of an animal and collection of serum (polyclonal) or spleen cells (to produce hybridomas by fusion with appropriate cell lines).

Methods of producing polyclonal antibodies from various species, including mice, rodents, primates, horses, pigs, rabbits, poultry, etc. may be found, for instance, in Vaitukaitis *et al.* [29]. Briefly, the antigen is combined with an adjuvant (e.g., Freud's adjuvant) and administered to an animal, typically by sub-cutaneous injection. Repeated injections may be performed. Blood samples are collected and immunoglobulins or serum are separated.

Methods of producing monoclonal antibodies from various species as listed above may be found, for instance, in Harlow *et al.* (Antibodies: A laboratory Manual, CSH Press, 1988) or in Kohler *et al.* (Nature 256 (1975) 495),

WO 02/098919

PCT/EP02/06110

8

incorporated therein by reference. Briefly, these methods comprise immunizing an animal with the antigen, followed by a recovery of spleen cells which are then fused with immortalized cells, such as myeloma cells. The resulting hybridomas produce the monoclonal antibodies and can be selected by limit dilutions to  
5 isolate individual clones. Antibodies may also be produced by selection of combinatorial libraries of immunoglobulins, as disclosed for instance in Ward et al (Nature 341 (1989) 544).

Preferred antibodies of this invention are prepared by immunization with a pure synthetic apo CIII polypeptide as described above, preferably comprising  
10 SEQ ID NO: 1, or with an immunogenic sub-fragment thereof, e.g., a subfragment comprising at least an epitope.

This invention also relates to a method of producing an anti-apo CIII antibody, comprising injecting a polypeptide of SEQ ID NO: 1 or an immunogenic fragment or derivative thereof to a non-human animal and  
15 collecting the antibodies or antibody-producing cells. The method is simpler than previously disclosed methods using purified native apo CIII and allows the production of specific and immunoprecipitating antibodies. The specificity can be verified by showing the absence of cross-reactivity with other blood circulating proteins. More generally, the specificity indicates that the antibodies bind apo  
20 CIII with a higher affinity than other antigens. As illustrated in the examples, polyclonals of this invention are immunoprecipitating and can thus be used to detect or dose apo CIII with high efficacy.

The antibodies may be coupled to heterologous moieties, such as toxins, labels, drugs or other therapeutic agents, covalently or not, either directly or  
25 through the use of coupling agents or linkers. Labels include radiolabels, enzymes, fluorescent labels, magnetic particles and the like. Toxins include diphtheria toxins, botulinum toxin, etc. Drugs or therapeutic agents include lymphokines, antibiotics, antisense, growth factors, etc. Methods of using such heterologous moieties are illustrated, for instance, in US4,277,149 and  
30 US3,996,345.

The antibodies of this invention have various applications, including therapeutic, diagnostic, purification, detection, prophylactic, etc.

5 In vitro, they can be used as screening agents or to purify the antigen from various samples, including various biological samples (e.g., blood samples). They can also be used to detect or quantify the presence (or amounts) of total apo CIII or apo CIII in apo B and non apo B containing lipoparticles in a sample collected from a subject, typically a blood sample from a mammalian, specifically a human  
10 subject.

In this regard, an other object of this invention is a method of detecting total apo CIII or apo CIII in apo B and non apo B containing lipoparticles in a biological sample, comprising contacting the sample with an antibody as defined above (including fragments or derivatives thereof) and detecting the presence of  
15 antibody-antigen immune complexes. Typically the method allows the determination of the levels of total apo CIII or apo CIII in apo B and non apo B containing lipoparticles in a sample, by assessing the (relative) amounts of immune complexes in the sample and comparing the same to a standard condition or a calibration curve, for instance. The method may be performed using any  
20 conventional technique, such as ELISA (direct or competitive immuno-assay), RIA, EIA etc. However, in a most preferred embodiment, the method is a nephelometric assay. Indeed, as indicated above, the antibodies are specific and can immunoprecipitate apo CIII in a sample.

In the nephelometric assay, the intensity of light scattered by particles in  
25 suspension is measured using an analyser. The particles are formed by the immunoprecipitation reaction that occurs in a polymer-enhancing buffer when a specific antibody is brought into contact with the specific antigen. The complexing of an antigen with an antibody specific for the antigen occurs at a rate which increases gradually at first, then rapidly, and finally proceeds through a  
30 peak value that is proportional to the antigen concentration. The assay is based on

WO 02/098919

PCT/EP02/06110

10

a measure of the maximum rate of change from the scattered light signal, which is correlated (and can be converted) to the antigen concentration. Typically, the nephelometric assay is performed using Beckman immunochemistry systems (IMAGE), which presents the results on the alphanumeric display. The nephelometric assay of this invention is advantageous since it is rapid and reproducible and can be implemented on a high throughput basis. Indeed, this assay is performed in a few seconds only for each sample, versus one day in most prior art techniques, and the coefficient of variation is 4 % only versus 10 % for apo CIII detection assays described in the prior art.

10

A particular object of this invention thus lies in a method of measuring total apo CIII or apo CIII in apo B and non apo B containing lipoparticles in a biological sample, comprising contacting the sample (or a dilution thereof) with an antibody as described above (including fragments or derivatives thereof), typically at various dilutions thereof, and assessing the formation of apo CIII-antibody immune complexes by nephelometric assay. More preferably, the antibody is subjected to a treatment prior to being contacted with the sample, in order to remove non-immunoglobulin proteins and/or to concentrate the antibody. The treatment typically comprises contacting the antibodies with polyethylene glycol (PEG), as described for instance in Ritchie et al. (31). Typically, from 0.5 to 1 µg of specific antibodies are used in the assay, although the skilled person may use different quantities without departing from the instant invention.

In a nephelometric assay, polyclonal antibodies are generally used.

25

The method can be carried out on various biological samples, including plasma, serum, interstitial fluid, supernatant of cultured cells etc. The sample may be collected from a subject (e.g. a human subject) and used directly for the assay. Alternatively, the sample may be diluted and/or stocked (for instance in frozen state) for later testing.

30

WO 02/098919

PCT/EP02/06110

11

The method can be applied to the detection of soluble apo CIII or of apo CIII-containing lipoparticles. As indicated above, apo CIII is contained in various lipoparticles such as high density lipoproteins (HDL), low density lipoproteins (LDL), very low density lipoproteins (VLDL), chylomicrons, etc. Some of these lipoparticles are atherogenic and their (relative) amounts in a sample correlate with a pathological condition of a subject. In particular, apo CIII-containing lipoparticles that further contain apolipoprotein B are known to be highly atherogenic (ref Franck Sacks, Zouher). In this respect, the ratio apo CIII LpB / apo CIII Lp non B is indicative of atherosclerosis initiation, development or progression in a subject. The present invention now allows a mass measurement of apo CIII-containing lipoparticles using anti-synthetic apo CIII antibodies, with high efficacy, reliability and throughput.

More particularly, the invention can be used to detect the atherogenic, apo CIII LpB in a sample. In a particular embodiment, the method comprises the steps of:

- (a) determining the amount of total apo CIII in a sample
- (b) removing apo B-containing lipoparticles from the sample, and
- (c) determining the amount of apo CIII in non apoB containing lipoparticles in the sample.

By deduction, the amounts obtained in (a) and (c) allow the determination of the amounts of apo CIII in apoB containing lipoparticles in the sample, said particles being the most atherogenic. Removal of apoB containing lipoparticles in step (b) can be performed by treatment of an aliquote of said sample with an immunoprecipitating anti apoB antibody.

The detection assay can be used in various experimental, clinical and/or diagnostic conditions.

In particular, the method can be used to detect predisposition of individuals at risk of developing lipid-metabolism disorders. A particular object of this

invention is a method of detecting predisposition or individuals at risk of developing lipid-metabolism disorders, comprising the measurement in vitro of apo B and non apo B containing lipoparticles in a sample from a subject with an antibody as defined above (including fragments or derivatives thereof), wherein  
5 increased levels of apo CIII or apo CIII in apo B containing lipoparticles (as compared to a mean value of a normal subjects) are indicative of individuals at risk of developing lipid metabolism disorders. Typically, a significant physiopathologic apo CIII in apo B containing lipoparticles level is an increase of at least 20%, preferably at least 50% over the normal mean value.

10 An other object of this invention is a method of monitoring hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in a subject, comprising detecting in vitro apo CIII or apo CIII-containing lipoparticles level in a sample using an antibody as defined above (including fragments or derivatives thereof).

An other object of this invention is a method of monitoring the efficacy of  
15 a lipid-metabolism-related disorder treatment in a subject comprising detecting apo CIII or apo CIII in apo B and non apo B containing lipoparticles levels in vitro in a sample from said subject using an antibody as defined above (including fragments or derivatives thereof), after administration of said treatment to the subject. Typically, the efficacy of the treatment is correlated to the apo CIII levels  
20 in the subject. The efficacy can be correlated to the ability of the treatment to regulate apo CIII or apo CIII in apo B and non apo B containing lipoparticles level or activity or to restore normal apo CIII or apo CIII in apo B and non apo B containing lipoparticles level in a subject.

25 A further object of this invention is a method of evaluating the physiological state of a subject at his lipid metabolism level, comprising detecting apo CIII in apo B and apo non B containing lipoparticles levels in vitro in a sample from said subject using an antibody as defined above (including fragments or derivatives thereof).

WO 02/098919

PCT/EP02/06110

13

The antibodies can also be used to screen compounds or diets that might modulate total apo CIII and apo CIII in apo B and non apo B containing lipoparticles concentration in serum. Typically, the method comprises administering a compound or subjecting an animal or patient to a diet, collecting  
5 a biological sample from the animal or patient and detecting or dosing total apo CIII and apo CIII in apo B and non apo B containing lipoparticles level in said sample using an antibody as defined above (including fragments or derivatives thereof).

10 As indicated above, these methods can be carried out on various samples (typically plasma or serum) and can be performed by ELISA, RIA, EIA, etc., most preferably by nephelometric assay.

This invention also relates to a kit comprising a polypeptide or an antibody  
15 as described above. The kit can be used to detect or quantify apo CIII in apo B and non apo B containing lipoparticles in any sample. Most preferred kits comprise an antibody as defined above and reagents to perform or detect (or quantify) an immune reaction, particularly an antibody-antigen complex. Reagents include labels, buffers, substrates, etc. The kits typically comprise  
20 containers for the different reagents and products, and may further comprise a support or other device suitable to perform the assay.

Further aspects and advantages of this invention will be disclosed in the following examples, which should be regarded as illustrative and not limiting the  
25 scope of this application.

#### Legend to the Figures

Figure 1 : Antibody specificity

30 Figure 2 : Antibody affinity for VLDL and HDL

Figure 3 : Apo CIII nephelometric assay. Calibration curve.

Figure 4 : Correlation study

### Examples

5

#### **1. Apo CIII synthesis**

The polypeptides were synthesized by the solid phase method (26) on an automated synthesizer Model ABI 431 A (Applied Biosystems Inc.) using  
10 Boc/Bzl strategy on 0.5 mmol of PAM-Ala resin. Each amino acid was coupled twice by dicyclohexylcarbodiimide/hydroxybenzotriazole without capping.

The crude products were purified and analysed by reversed-phase HPLC on a Vydac C18 column using linear gradient from 0 to 100% Buffer B (Buffer A:  
15 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O and Buffer B: 0.05% TFA, 60% CH<sub>3</sub>CN in H<sub>2</sub>O). The molecular masses were determined using an API (Perkin-Elmer) of a simple quadrupole ion electrospray mass spectrometer equipped with an ion -spray (nebulizer-assisted electrospray) source (SCiex, Toronto, Canada).

Amino acid analysis was performed using Beckman 6300 amino acid analyser (Beckman instruments, Fullerton, CA), after hydrolysis with 6N HCl containing  
20 0.25 % phenol at 110°C for 24 h.

#### **2. Immunizations**

Anti-serum to apo CIII was prepared in rabbits essentially as described earlier  
25 (27). The peptide was emulsified in complete Freud's adjuvant and injected subcutaneously to rabbits using 0.5 mg peptide per injection for the two first injections followed at 15 day intervals with boosters in the same adjuvant but using only 0.25 mg of peptide.

#### **30 3. Isolation of anti-apo CIII immunoglobins (IgG)**

Ig G were prepared by modified protocol of Ritchie *et al* (31). Non immunoglobulin proteins were removed from immune-serum and the IgG are dialysed and concentrated.

5

#### 4. Specificity of the antibodies

Analytical immunoblot of VLDL, LDL and HDL were performed to assess the specificity of apo CIII antibodies. As shown in Figure 1, no cross-reaction was observed with the other proteins of all subclasses of lipoproteins, demonstrating the high specificity of the antibodies.

10

#### 5. Affinity of the antibodies towards apo CIII in VLDL and HDL lipoparticles

15

In this experiment, we determined whether the anti-synthetic apo CIII antibodies could measure apo CIII in VLDL and HDL with the same affinity, to validate the immuno-assay in apo CIII Lp B and apo CIII Lp non B particles measurement. The results are presented in Figure 2. The parallel curves of plasma, VLDL and HDL demonstrate the accuracy of the anti-synthetic apo CIII antibodies to recognize apo CIII in all these lipoproteins sub-classes. Furthermore, in addition to their advantageous properties and manufacturing conditions, control experiments have indicated that the present anti-synthetic apo CIII antibodies have an affinity which is at least as good as previous antibodies.

20

#### 6. Immuno-Nephelometric Assay

##### Reagents and materials

25  
30

**Table 1**

	design	References
Anti apo CIII IgGs	1 x 6.5 ml (300 tests)	Laboratory lot
Anti apo B Immunoglobulins	1 x 5 ml (100tests)	Laboratory lot
Diluant 1	4 x 120 ml (4 x 330 tests)	Beckman Coulter part No 447640
Diluant 2	4 x 120 ml (4 x 330 tests)	Beckman Coulter part No 447660
Buffer 1	4 x 120 ml (4 x 330 tests)	Beckman Coulter part No 447650
IMMAGE UDR Cartridge	10 (10 x 300 tests)	Beckman Coulter part No 447250
Microtubes	1000	Beckman Coulter part No 448162

Anti apo CIII immunoglobulins :

- Anti apo CIII IgG as produced in examples 2 and 3 above are ready to use. They  
5 can be refrigerated at 2 to 8°C for use in the week, or frozen at -20°C for use up  
to months. The immunoglobulins contain sodium azoture.

Anti apo B immunoglobulins :

- Anti apolipoprotein B IgG can be obtained from various sources or produced as  
10 described in examples 2 and 3. They can be refrigerated at 2 to 8°C for use in the  
week, or frozen at -20°C for use up to months. The immunoglobulins contain  
sodium azoture.

Standard :

- 15 Apo CIII standard is a human serum pool calibrated with electroimmunodiffusion  
assay and tested for HIV and hepatitis viruses, handled according to the usual

WO 02/098919

PCT/EP02/06110

17

precautions in order to prevent contamination. Standard apo CIII level is 2,5 mg/dl. For constructing the calibration curve, standard is diluted as indicated in Table 2.

5

Table 2

Points	Diluant 2 (µl)	Standard (µl)	Concentration (µg/ml)
1	175	25	0,3125
2	165	35	0,4375
3	150	50	0,6250
4	140	60	0,7500
5	130	70	0,8750
6	120	80	1,000
7	100	100	1,250
8	60	140	1,750
9	0	200	2,500

Sample preparation:

Fresh or frozen (-80°C) samples are recommended for analysis. Sera are collected according to established procedures in clinical laboratory testing. If needed, samples can be kept frozen for longer storage periods; frozen samples are stable for up to one year. Prior to use, the samples are diluted 3 fold in the diluent 1.

Preparation of samples without apo B particles:

In a test tube, add in the following order: 40 µl anti apo B, 40 µl of serum and 40 µl of diluant 1 of Beckman. Vortex and incubate the mixture 10 minutes at room temperature, and centrifuge at 3500 rpm for 10 minutes. The supernatant is collected for analysis. The final concentration of the samples without apoB is corrected because the 3 fold dilution of the supernatant.

20 Protocol:

WO 02/098919

PCT/EP02/06110

18

- . Program a user-defined reagent with the parameters listed below according to the IMMAGE Immunochemistry System Operations Manual.
- . Transfer antibody reagent to compartment A of a new User Defined Cartridge.
- . Transfer buffer 1 to compartment B of the cartridge.
- 5 . Enter the value from the standard (actual standard apo CIII value is 2,5 mg/dl) in parameter table according to the dilution scheme shown in table 2.
- . Use Diluent 2 as the sample diluent.

Summary:

Chem Name	Apo CIII	Units	mg/dl
Lot Number	See Cartridge	Protocol	Non-Competitive Nephelometric
Reagent Serial	See Cartridge	Reagent Expiration	To be defined by the user
Sample or Dilution Volume	20 µl	Gain	3
Reagent Buffer Volume	0 µl	Cal Dilution	1/5
Compartment Volume	20 µl	Sample Dilution	1/20*
Compartment Volume	200 µl	Reaction time	1/5**
			2 minutes

- 10 \* To be configured after calibration approval.

\*\* To be configured for apo CIII Lp non B measurement.

Results:

- 15 The results are presented on Figure 3. They show a very narrow coefficient of variation with a working range of 0.3-2.5 µg/ml. Reference Values obtained are: Total Apo CIII: 1,6 to 4,5 mg/dl; Apo CIII Lp non B: 0,5 to 3,5 mg/dl; Apo CIII LpB: < 2,3 mg/dl.
- 20 7. Comparison of the apo CIII nephelometric assay and apo CIII electroimmunodiffusion assay.

The characteristics and performance of the nephelometric assay of this invention were compared to those obtained with an electroimmunodiffusion assay (32). The results are reported in Table 3 below and illustrate the advantages of the nephelometric assay of this invention.

Table 3

	Nephelometric assay		Electroimmunodiffusion	
	Total apo CIII	Apo CIII Lp non B	Total apo CIII	Apo CIII Lp non B
CV (%)	2	4,2	9,7	7,7
Recovery (%)	101	105	103	ND*
Sensitivity (mg/dl)	0,06		0,09	
Delay (for 20 samples)	90 minutes		1 day	

\* Non Determined

#### 10 8. Correlation Study

20 serum samples analysed on the electro-immuno-difusion using SEBIA kit of Lp CIII were subsequently analysed using the IMMAGE method. The results are shown on Figure 4 and demonstrate the high correlation and accuracy of the nephelometric assay using antibodies of this invention.

#### 9. Other advantages of the invention

Other advantages and uses of the synthetic apo CIII polypeptides of this invention include :

WO 02/098919

PCT/EP02/06110

20

- use as a standard for the calibration of all the apo CIII assays (ELISA, RIA, electroimmunodiffusion, etc.)
- use in the investigation of the metabolic pathways of lipoproteins, like the inhibition of LpL activity (this enzyme is involved in the lipolysis of triglyceride-rich lipoprotein), or the inhibition of the uptake of apo B-containing lipoproteins by the LDL receptor.

Other advantages and uses of the antibodies of this invention include:

- use in all the immuno assays to quantify apo CIII.
- 10 - Use in the detection of apo CIII (Immunoblot, dot blot, immunohistochemistry and immunocytochemistry)
- Use in immuno-affinity and immunoprecipitation methods to purify the protein.

15

## References

1. Hoddis, H.N., and Mack W.J., *Triglyceride-rich lipoproteins and the progression of coronary artery disease*. *Curr. Opin. Lipidol.*, 1995, 6: p. 209-214.
- 5 2. Brewer, H.B., Shulman R., Herbert P., Roman R. and Werry K., *The complete amino acids sequence of alanine apolipoprotein from plasma very low density lipoproteins*. *J. Biol. Chem.*, 1974, 249: p. 4975-4984.
3. Lenich, C., Brecher P., Makrides S., Chobanian A. and Zannis V.I., *Apolipoprotein gene expression in rabbit: abundance, size and distribution of apolipoprotein mRNA species in different tissues*. *J. Lip. Res.*, 1988, 29: p. 755-764.
- 10 4. Ito, Y., Breslow J.L., Chait B.T., *Apolipoprotein C-III0 lacks carbohydrate residues: use of mass spectrometry to study apolipoprotein structure*. *J Lipid Res*, 1989, 30: p. 1781-1787.
- 15 5. Assman, G., and Ulenbruck G., *Characterization of oligosaccharide side chain of apolipoprotein CIII from human VLDL plasma*. *Biochimica and Biophysica Acta.*, 1989, 541: p. 234-240.
6. Pullinger, C.R., Malloy M.J., Shahidi A.K., Ghassemzadeh M., Duchateau P., Villagomez J., Allaart J. and Kane J.P., *A novel apolipoprotein C-III variant, apoC-III(Gln38->Lys), associated with moderate hypertriglyceridemia in a large kindred of Mexican origin*. *J Lipid Res*, 1997, 38: p. 1833-1840.
- 20 7. von Eckardstein, A., Holz H., Sandkamp M., Weng W., Funke H., Assmann G., *Identification of an apolipoprotein C-III variant in a family with hyperalphalipoproteinemia*. *J Clin Invest*, 1991, 87: p. 1724-1731.
- 25 8. Roghani, A., and Zannis V.I., *Mutagenesis of the glycosylation site of human Apo CIII. O-linked glycosylation is not required for Apo CIII secretion and lipid binding*. *J Biol Chem*, 1988, 263: p. 17925-17932.
9. Schonfeld, G., George P. K., Miller J., Reilly P. and Witztum J., *Apolipoprotein C-II and C-III levels in hyperlipoproteinemia*. *Metabolism*, 1979, 28(10): p. 1001-10.
- 30 10. Kashyap, M.L., Srivastava L. S., Hynd B. A., Gartside P. S. and Perisutti G., *Quantitation of human apolipoprotein C-III and its subspecies by radioimmunoassay and analytical isoelectric focusing: abnormal plasma triglyceride-rich lipoprotein apolipoprotein C-III subspecies concentrations in hypertriglyceridemia*. *J Lipid Res*, 1981, 22: p. 800-810.
- 35 11. Shelburne, F., Hanks J., Meyers W. and Quardford S.A., *Effect of apolipoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat*. *J. Clin. Inves.*, 1980, 65: p. 652-658.
12. Windler, E., and Havel R.J., *Inhibitory effect of C apolipoproteins from rats and human on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnant by the perfused rat liver*. *J. Lip. Res.*, 1985, 26: p. 556-563.
13. Brown, V., and Bakinsky M.L., *Inhibition of lipoprotein lipase by an apolipoprotein of human very low density lipoproteins*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1972, 46: p. 375-382.
- 45 14. Krauss, R.M., Herbert P.N., Levy R.I. and Fredrickson D.S., *Further observations on the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins*. *Circ. Res.*, 1973, 33: p. 403-411.

15. Wang, C.S., Mc Conathy W.J., Kloer H.U. and Alaupovic P., *Modulation of lipoprotein lipase activity. The effect of apolipoprotein CIII*. J. Clin. Invest., 1985. 75: p. 384-390.
- 5 16. Mc Conathy, W.J., Gesquiere J.C., Mass H., Tartar A., Fruchart J.C. and Wang C.S., *Inhibition of lipoprotein lipase activity by synthetic peptides of apo CIII*. J. Lip. Res., 1972. 33: p. 995-1003.
17. Kinnemen, P.K.J., and Enholm C., *Effect of serum and C apoproteins from VLDL on post-heparin plasma hepatic activity*. FEBS, 1976. 65: p. 354-357.
18. Blankenhorn, D.H., Alaupovic P., Wickham E., Chin H.P. and Azen S.P.,  
10 *Prediction of angiographic change in native human coronary bypass grafts lipid and non lipid factors*. Circulation., 1990. 81: p. 470-476.
19. Hoddis, H.N., Mack W.J., Azen S.P., Alaupovic P., Pogogla J.M., Labree L.,  
Hemphill L.C., Kramsch D.M. and Blackerhorn D.H., *Triglyceride and  
cholesterol rich lipoproteins have differential effect on mild/moderate and severe  
15 lesion progression as assessed by quantitative coronary angiography in  
controlled trial lovastatin*. Circulation., 1994. 90: p. 42-49.
20. Koren, E., Corder C., Mueller G., Centurion H., Hallum G., Fesmire J., Mc  
Conathy W.J. and Alaupovic P., *Triglyceride-rich lipoprotein lipoparticles  
correlate with severity of coronary disease*. Atherosclerosis, 1996. 122: p. 105-  
20 115.
21. Aalto-Setälä, K., Fisher E.A., Chen X., Chajek-Shaul T., Hayek T., Zechner R.,  
Walsh A., Ramakrishnan R., Ginsberg H.N. and Breslow J.L., *Mechanism of  
hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice.  
Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with  
25 increased apo CIII and reduced apo E on the particles*. J Clin Invest, 1992. 90: p.  
1889-1900.
22. Harrold, H.J., Van Barlinger J., Harmen de J., Erklens W.D. and Tjerk W.A de  
Bruin., *Lipoprotein lipase enhanced binding of human triglyceride rich  
lipoproteins to heparan sulfate : Modulation by apolipoprotein E and  
apolipoprotein C*. J. Lip. Res., 1996. 37: p. 754-760.
- 30 23. Yang, C.Y., Gu Z.W., Valentinova N., Pownall H.J., Lee B., Yang M., Xie Y.H.,  
Guyton J.R., Vlasik T.N., Fruchart J.C., and Gotto A.M., *Human very low  
density lipoprotein structure: interaction of the C apolipoproteins with  
apolipoprotein B-100*. J Lipid Res, 1993. 34: p. 1311-1321.
- 35 24. Clavey, V., Lestavel-Delattre S., Copin C., Bard J.M. and Fruchart J.C.,  
*Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and  
apolipoproteins CI, CII, CIII and E*. Arth. Thromb. And Vasc. Biol., 1995. 15: p.  
963-971.
25. Blankenhorn, D.H., Alaupovic P., Wickham E., Chin H.P. and Azen S.P.,  
40 *Prediction of angiographic change in native human coronary arteries and  
aortocoronary bypass grafts. Lipid and nonlipid factors*. Circulation., 1990. 81:  
p. 470-476.
26. Holmquist, L., *Quantitation of human serum very low density apolipoproteins C-  
I, C-II, C-III and E by enzyme immunoassay*. J Immunol Methods, 1980. 34(3): p.  
45 243-51.
27. Curry, M.D., McConathy W. J., Fesmire J. D. and Alaupovic P., *Quantitative  
determination of human apolipoprotein C-III by electroimmunoassay*. Biochim  
Biophys Acta, 1980. 617(3): p. 503-13.

28. Merrifield, R.B., *Solide phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide.* J. Am. Chem. Soc., 1963. **85**: p. 2149-2154.
29. Vaitukaitis, J., et al., *A method for producing specific antisera with small doses of immunogen.* J Clin Endocrinol Metab, 1971. **33**(6): p. 988-91.
- 5 30. Bassiri, R.M., Dvorak J. and Utiger R.D., *Thyrotropin-releasing hormone*, in *Methods of hormone radioimmunoassay*, B.M. In: Jaffe, and Behrman H.R. (Eds), Editor. 1979, New York Academic Press: New York. p. p. 46.
- 31 Ritchie, R.F., and J. Stevens, *Qualifications for acceptable anti-serum performance in the automated immunoprecipitation system: A brief review of commercially available reagents*, in *advances in Automated Analysis, Technicon Symposia*. 1972, Mediad Inc: Tarry-town, NY. p. 9-14.
- 10 32. Luc, G., Fievet C., Arveiler D., Evans A.E., Bard J.M., Combien F, Fruchart J.C. and Ducimetiere P., *Apolipoproteins CIII and E in apo B and non apo B containing lipoproteins in two populations at contrasting risk for myocardial infarction: the ECTIM study.* J. Lipid. Res., 1996. **37**: p. 508-517.
- 15

## REVENDICATIONS

1. A method of detecting apo CIII or apo CIII in apo B and non apo B containing lipoparticles in a biological sample, comprising (i) contacting the sample with an antibody raised by immunization with a substantially pure, synthetic polypeptide comprising amino acid sequence SEQ ID NO: 1, or with a fragment or derivative of said antibody having substantially the same antigenic specificity and (ii) detecting the presence of antibody-antigen immune complexes.
2. The method of claim 1, wherein the presence of antibody-antigen immune complexes is determined by ELISA, RIA, sandwich immuno-assay or direct immunoassay.
3. The method of claim 1, wherein the presence of antibody-antigen immune complexes is determined by nephelometric assay.
4. The method of claim 1, wherein the antibody is obtained by injecting a substantially pure, synthetic polypeptide comprising amino acid sequence SEQ ID NO: 1 to a non-human animal and collecting the antibodies or antibody-producing cells.
5. The method of any one of claims 1 to 4, wherein the antibody is a polyclonal antibody.
6. The method of any one of claims 1 to 4, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
7. A method of detecting apo CIII or apo CIII-containing lipoparticles in a biological sample, comprising (i) contacting the sample with an antibody that binds a substantially pure, synthetic polypeptide comprising amino acid sequence

WO 02/098919

PCT/EP02/06110

25

- SEQ ID NO: 1, or with a fragment or derivative of said antibody having substantially the same antigenic specificity and (ii) assessing the formation of apo CIII-antibody immune complexes by nephelometric assay.
- 5           8. The method of claim 7, wherein the antibody is a polyclonal antibody obtained by injecting a substantially pure, synthetic polypeptide comprising amino acid sequence SEQ ID NO: 1 to a non-human animal and collecting the antibodies.
- 10          9. The method of any one of claims 1 to 8, wherein the biological sample is a blood sample or a serum sample.
- 15           10. A method of detecting predisposition or individuals at risk of developing lipid-metabolism disorders, comprising detecting in vitro apo CIII or apo CIII in apo B and non apo B containing lipoparticles in a sample from a subject with an antibody that binds a substantially pure, synthetic polypeptide comprising amino acid sequence SEQ ID NO: 1, or with a fragment or derivative of said antibody having substantially the same antigenic specificity.
- 20           11. A method of monitoring the efficacy of a lipid-metabolism-related disorder treatment in a subject comprising detecting total apo CIII and apo CIII in apo B and non apo B containing lipoparticles levels in vitro in a sample from said subject using an antibody that binds a substantially pure, synthetic polypeptide comprising amino acid sequence SEQ ID NO: 1, or with a fragment or derivative
- 25           of said antibody having substantially the same antigenic specificity.
12. Use of an antibody that binds a substantially pure, synthetic polypeptide comprising amino acid sequence SEQ ID NO: 1, or of a fragment or derivative of said antibody having substantially the same antigenic specificity, to

screen in vitro compounds or diets that modulate apo CIII apo B and non apo B containing lipoparticles concentration in serum.

13. A kit comprising an antibody that binds a substantially pure, synthetic polypeptide comprising amino acid sequence SEQ ID NO: 1, or a fragment or derivative of said antibody having substantially the same antigenic specificity, and a reagent for performing an antigen-antibody immune reaction.

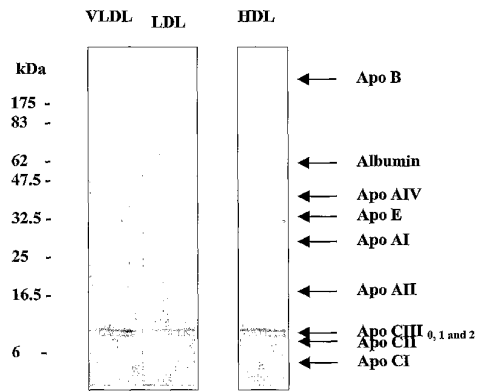


Figure 1

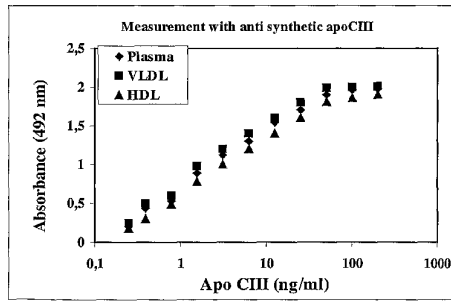


Figure 2

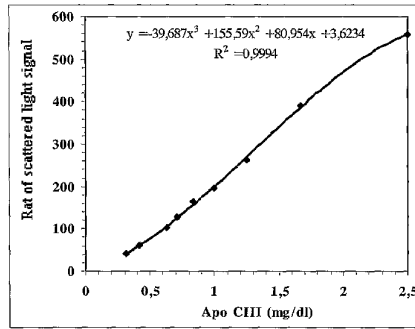


Figure 3

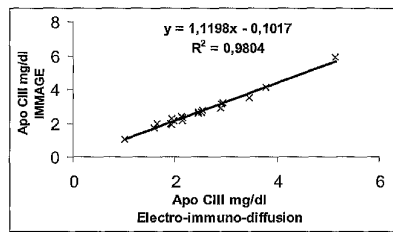


Figure 4

WO 02/098919

1/1

PCT/EP02/06110

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; GENFIT

<120> New Method for ApoCIII measurement in apoB and non apoB  
containing particles

&lt;130&gt; B0084W0

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 79

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met Gln Gly Tyr Met  
1 5 10 15Lys His Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu Ser Ser Val Gln Glu  
20 25 30Ser Gln Val Ala Gln Gln Ala Arg Gly Trp Val Thr Asp Gly Phe Ser  
35 40 45Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys Asp Lys Phe Ser Glu Phe  
50 55 60Trp Asp Leu Asp Pro Glu Val Arg Pro Thr Ser Ala Val Ala Ala  
65 70 75

## 【 国際公開パンフレット ( コレクション ) 】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
12 December 2002 (12.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/098919 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 14/775, 16/18, A61P 9/00
- (21) International Application Number: PCT/EP02/06110
- (22) International Filing Date: 4 June 2002 (04.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01401445.0 5 June 2001 (05.06.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): GENFIT [FR/FR], Parc Eurasanté, Lille Métropole, 885, rue Eugène Avinée, F-59120 Loos (FR).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): NAJIB-FRUCHART, Jansita [FR/FR], 185, rue Clémenceau, F-59211 Santes (FR); MAJID, Zouher [MA/FR], 89, rue des Chrysanthèmes, F-59700 Marc en Baroeul (FR).
- (74) Agents: BECKER, Philippe et al.; Becker et Associés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).
- (81) Designated States (national): AI, 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, GI, 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, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BH, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaration under Rule 4.17:  
— of inventorship (Rule 4.17(vi)) for US only
- Published:  
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:  
30 October 2003
- 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 02/098919 A3

(54) Title: METHOD FOR APO CIII MEASUREMENT IN APOB AND NON APOB CONTAINING PARTICLES

(57) Abstract: The present invention relates to a new method for measuring apolipoprotein CIII ("apo CIII") in apo B and non apo B containing lipoparticles. This invention also relates to synthetic apo CIII products, corresponding antibodies, kits comprising the same, and their use to detect, quantify and/or monitor apo CIII levels in a sample, as well as to quantify and/or monitor atherogenic lipoparticle levels in a sample. The above compounds and kits can also be used to modulate apo CIII levels or activity *in vitro* or *in vivo*, and to regulate lipid metabolism in a subject.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/06110
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/775 C07K16/18 A61P9/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category <sup>1</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 36785 A (ABBOTT LAB) 22 July 1999 (1999-07-22) see whole doc. esp. claim 36, p.18ff and p.23 ---	1-13
Y	SANDKAMP M. ET AL.,: "determination of apolipoprotein B in apolipoprotein CII-CIII containing lipoproteins by immunoenzymetric assay" EUR. J. CLINICAL CHEMISTRY AND CLINICAL BIOCHEMISTRY, vol. 30, no. 4, - 1992 pages 223-228, XP001022717 the whole document --- -/--	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex		
<sup>1</sup> Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document relating 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 ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *** 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. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 July 2003	Date of mailing of the international search report 16/07/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 360-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Mueller, F	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
 PCT/EP 02/06110

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHARPE C R ET AL.: "Human apolipoproteins AI, AII, CII and CIII. cDNA sequences and mRNA abundance" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 12, no. 9, 1984, pages 3917-3932, XPO02173832 ISSN: 0305-1048 see whole doc. esp. fig 6, p. 3926, abstract and discussion ----	
A	SPARROW J.T.: "an improved poly styrene support for solid phase peptide synthesis" J. ORGANIC CHEMISTRY, vol. 41, no. 8, - 1976 pages 1350-1353, XPO01022295 see whole doc. esp. p.1350, 1.col., fig.1 ----	
A	FAIRWELL T. ET AL.: "Human plasma apolipoprotein C-II: total solid-phase synthesis and chemical and biological characterization" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 84, July 1987 (1987-07), page 4796 XPO01018877 see whole doc. esp. materials and methods and p. 4800, 1.col., last par. ff. ----	
P, X	WD 01 64008 A (MONTEYNE PHILIPPE ; SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG (BE); PALMANTIER REMI) 7 September 2001 (2001-09-07) see whole doc. esp. p.8, 18 and 19 and claims ----	12, 13

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 02/06110**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 4-6 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP 02/06110

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9936785 A	22-07-1999	US 2002177240 A1	28-11-2002
		CA 2317419 A1	22-07-1999
		EP 1047944 A1	02-11-2000
		WO 9936785 A1	22-07-1999
WO 0164008 A	07-09-2001	AU 4649301 A	12-09-2001
		BR 0108924 A	29-04-2003
		CA 2401755 A1	07-09-2001
		CN 1418106 T	14-05-2003
		CZ 20022971 A3	12-02-2003
		WO 0164008 A2	07-09-2001
		EP 1267908 A1	02-01-2003
		HU 0300099 A2	28-05-2003
		NO 20024172 A	01-11-2002

---

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

(72) 発明者 マジド、ズーヘル

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

专利名称(译)	测量载脂蛋白B中的载脂蛋白CIII和含有非载脂蛋白B的颗粒的新方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005502029A</a>	公开(公告)日	2005-01-20
申请号	JP2003502039	申请日	2002-06-04
[标]申请(专利权)人(译)	Jenfi		
申请(专利权)人(译)	Jenfi		
[标]发明人	ナジブフリユシャルジャミラ マジドズーヘル		
发明人	ナジブ-フリユシャル,ジャミラ マジド,ズーヘル		
IPC分类号	G01N33/53 A61P9/00 C07K14/775 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/92		
CPC分类号	C07K14/775 G01N33/92 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.W G01N33/543.581.Z G01N33/577.B		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	2001401445 2001-06-05 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及测定apo B中的载脂蛋白CIII (“apo CIII”) 和含有非apo B的脂质颗粒的新方法。本发明还涉及用于检测, 定量和/或监测样品中的apoCIII水平的方法, 以及合成的apo CIII产物, 相应的抗体, 包含其的试剂盒和神经源性脂质。它还涉及其用于量化和/或监测颗粒水平的用途。上述化合物和试剂盒也可用于在体外或体内调节apo CIII水平或活性, 并调节受试者的脂质代谢。

	設定	備考
抗アポCIII IgG	1 x 6.5 ml (300 tests)	研究室ロット
抗アポB免疫グロブリン	1 x 5 ml (100tests)	研究室ロット
希釈剤1	4 x 120 ml (4 x 330 tests)	Beckman Coulter 部品番号447640
希釈剤2	4 x 120 ml (4 x 330 tests)	Beckman Coulter 部品番号447660
緩衝液1	4 x 120 ml (4 x 330 tests)	Beckman Coulter 部品番号447650
IMMAGE UDR カートリッジ	10 (10 x 300 tests)	Beckman Coulter 部品番号447250
マイクロ管	1000	Beckman Coulter 部品番号448162