



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 146**

51 Int. Cl.:
C07K 14/775 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08151489 .5**
96 Fecha de presentación : **05.04.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **2006301**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.12.2008**

54 Título: **Terapia de inmunización basadas en péptidos para el tratamiento de aterosclerosis.**

30 Prioridad: **05.04.2001 SE 0101232**
09.11.2001 SE 0103754

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.10.2011

73 Titular/es: **FORSKARPATENT I SYD AB.**
223 70 Lund, SE
Cedars-Sinai Medical Center

72 Inventor/es: **Nilsson, Jan y**
Prediman, Shah K.

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 367 146 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Terapia de inmunización basada en péptidos para el tratamiento de aterosclerosis

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un nuevo péptido, en particular a un péptido que va a usarse para terapia de inmunización para el tratamiento de aterosclerosis.

10 En particular, la invención incluye el uso de un péptido para diagnosticar la presencia o ausencia de anticuerpos relacionados con el aumento o la disminución de riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares isquémicas.

Antecedentes

15 La aterosclerosis es una enfermedad crónica que produce un engrosamiento de la capa más interna (la íntima) de arterias de tamaño grande y mediano. Disminuye la circulación sanguínea y puede producir isquemia y destrucción de tejido en órganos suministrados por el vaso afectado. La aterosclerosis es la causa principal de enfermedad cardiovascular que incluye infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y enfermedad de las arterias periféricas. Es la causa principal de muerte en el mundo occidental y se predice que se convertirá en la causa principal de muerte en el mundo entero dentro de dos décadas.

20 La enfermedad se inicia por la acumulación de lipoproteínas, principalmente la lipoproteína de baja densidad (LDL), en la matriz extracelular del vaso. Estas partículas de LDL se agregan y experimentan una modificación oxidativa. La LDL oxidada es tóxica y produce lesión vascular. La aterosclerosis representa en muchos sentidos una respuesta a esta lesión que incluye inflamación y fibrosis.

25 En 1.989, Palinski y colaboradores identificaron autoanticuerpos en circulación contra LDL oxidada en seres humanos. Esta observación sugirió que la aterosclerosis puede ser una enfermedad autoinmunitaria producida por reacciones inmunitarias contra lipoproteínas oxidadas. En ese momento, varios laboratorios empezaron a buscar asociaciones entre títulos de anticuerpos contra LDL oxidada y enfermedad cardiovascular. Sin embargo, el cuadro que apareció de estos estudios estaba lejos de ser claro. Existieron anticuerpos contra un gran número de diferentes epítopes en LDL oxidada, pero la estructura de estos epítopes era desconocida. Por tanto, el término "anticuerpos de LDL oxidada" se refirió a una mezcla desconocida de diferentes anticuerpos, en vez de a un anticuerpo específico. Los anticuerpos IgM independientes de linfocitos T fueron más frecuentes que los anticuerpos IgG dependientes de linfocitos T.

30 Lo anticuerpos contra LDL oxidada estaban presentes en tanto pacientes con enfermedad cardiovascular como en controles sanos. Aunque algunos estudios previos informaron de asociaciones entre títulos de anticuerpos de LDL oxidada y enfermedad cardiovascular, otros no pudieron encontrar tales asociaciones. Una debilidad principal de estos estudios era que las pruebas de ELISA usadas para determinar títulos de anticuerpos usaron partículas de LDL oxidada como ligando. La composición de LDL es diferente en diferentes individuos, el grado de modificación oxidativa es difícil tanto de controlar como de evaluar y no pueden determinarse los niveles de anticuerpos contra los diferentes epítopes en las partículas de LDL oxidada. Hasta cierto punto, debido a los problemas técnicos, ha sido difícil evaluar la función de respuestas de anticuerpos contra LDL oxidada usando las técnicas disponibles hasta este punto, pero, sin embargo, no es posible crear componentes bien definidos y reproducibles de una vacuna si tuvieran que usarse partículas de LDL oxidada intactas.

35 Otra forma para investigar la posibilidad de que reacciones autoinmunitarias contra LDL oxidada en la pared vascular desempeñen una función clave en el desarrollo de aterosclerosis es inmunizar animales contra su propia LDL oxidada. La idea tras este enfoque es que si las reacciones autoinmunitarias contra LDL oxidada se refuerzan usando técnicas de inmunización clásicas, esto podría producir un aumento de la inflamación vascular y progresiva de aterosclerosis. Para probar esta hipótesis se inmunizaron conejos con LDL oxidada homóloga y luego se indujo aterosclerosis alimentando a los animales con una dieta rica en colesterol durante 3 meses.

40 Sin embargo, a diferencia de la hipótesis original, la inmunización con LDL oxidada tiene un efecto protector que reduce la aterosclerosis aproximadamente el 50%. También se obtuvieron resultados similares en un estudio posterior en el que la dieta rica en colesterol se combinó con lesión por globo vascular para producir un desarrollo de placas más agresivo. En paralelo a los estudios de los inventores, varios otros laboratorios informaron de observaciones similares. Considerados en conjunto, los datos disponibles demuestran claramente que existen reacciones inmunitarias que protegen contra el desarrollo de aterosclerosis y que esto implica autoinmunidad contra LDL oxidada.

45 Estas observaciones también sugieren la posibilidad de desarrollar una inmunoterapia o "vacuna" para el tratamiento de enfermedad cardiovascular basada en aterosclerosis en el hombre. Un enfoque para hacer esto sería inmunizar un individuo con su propia LDL después de haberse oxidado por exposición a, por ejemplo, cobre. Sin embargo, este enfoque es complicado por el hecho de que no se sabe qué estructura en la LDL oxidada es responsable de la

inducción de la inmunidad protectora y si la LDL oxidada también puede contener epítopes que puedan dar lugar a reacciones inmunitarias adversas.

La identificación de epítopes en LDL oxidada es importante por varios aspectos:

Primero, es probable que uno o varios de estos epítopes sean responsables de la activación de la respuesta inmunitaria antiaterogénica observada en animales inmunizados con LDL oxidada. Por tanto, los péptidos que contienen estos epítopes pueden representar una posibilidad para el desarrollo de una inmunoterapia o "vacuna contra la aterosclerosis" en el hombre. Además, pueden usarse para el tratamiento terapéutico de aterosclerosis desarrollada en el hombre.

En segundo lugar, los péptidos que contienen los epítopes identificados pueden usarse para desarrollar ELISA que pueden detectar anticuerpos contra estructura específica en LDL oxidada. Tales ELISA serían más precisos y fidedignos que los actualmente disponibles usando partículas de LDL oxidada como antígeno. También permitirían el análisis de respuestas inmunitarias contra diferentes epítopes en LDL oxidada asociada a enfermedad cardiovascular.

La patente de EE.UU. 5.972.890 se refiere a un uso de péptidos para diagnosticar aterosclerosis. La técnica presentada en dicha patente de EE.UU. es por principio una forma de diagnóstico radiofísico. Una secuencia de péptidos se marca radiactivamente y se inyecta en la circulación sanguínea. Si esta secuencia de péptidos es idéntica a las secuencias presentes en la apolipoproteína B, se unirá al tejido en el que hay receptores presentes para la apolipoproteína B. En vasos, esto está por encima de toda la placa aterosclerótica. La concentración de radiactividad en la pared del vaso puede entonces determinarse, por ejemplo, por medio de una gammacámara. Por tanto, la técnica es un procedimiento de diagnóstico radiofísico basado en que secuencias de péptidos radiactivamente marcadas se unirán a sus receptores de tejido normales presentes en la placa aterosclerótica y se detectarán usando un análisis de radiactividad externo. Es un procedimiento de análisis directo para identificar placa aterosclerótica. Requiere que al paciente se le administren compuestos radiactivos.

La técnica de la presente invención se basa en principios y procedimientos bastante diferentes. Según la reivindicación 1, la invención se refiere a fragmentos IEIGLEGKGFPEPTLEALGK (SEC ID N°: 31) de la apolipoproteína B para inmunización contra enfermedad cardiovascular, además de a un procedimiento para diagnosticar inmunorreacciones contra secuencias de péptidos de la apolipoproteína B. Tales inmunorreacciones han mostrado a su vez que aumentan en individuos que tienen una aterosclerosis desarrollada. La presente técnica se basa en la unión de secuencias de péptidos en el fondo de pocillos de polímero. Cuando una muestra de sangre se añade a los péptidos, se unirá a los anticuerpos que son específicos para estas secuencias. Entonces, la cantidad de anticuerpos unidos se determina usando un procedimiento/técnica inmunológico. Por tanto, a diferencia de la técnica de dicha patente de EE.UU., esto no es un procedimiento de determinación directa para identificar y localizar placa aterosclerótica, pero determina una respuesta inmunológica que muestra un alto grado de covariación con la extensión de la aterosclerosis.

Por tanto, el principio básico de la presente invención es bastante diferente del de dicha patente. Esta última depende de la unión de secuencias de péptidos a los receptores normales de las lipoproteínas presentes en tejido aterosclerótico, mientras que la primera se basa en el descubrimiento de inmunorreacciones contra secuencias de péptidos y la determinación de anticuerpos para estas secuencias de péptidos.

Estudios publicados (Palinski y col., 1995, y George y col., 1998) han mostrado que la inmunización contra LDL oxidada reduce el desarrollo de aterosclerosis. Esto indicaría que las inmunorreacciones contra LDL oxidada tienen en general un efecto protector. Sin embargo, los resultados facilitados en este documento han mostrado sorprendentemente que esto no es siempre el caso. Por ejemplo, la inmunización usando una mezcla de péptidos n° 10, 45, 154, 199 y 240 dio lugar a un aumento del desarrollo de aterosclerosis. La inmunización usando otras secuencias de péptidos, por ejemplo, secuencias de péptidos n° 1 y 30 a 34 carece de efecto total sobre el desarrollo de la aterosclerosis. Los resultados son sorprendentes debido a que proporcionan la base del hecho de que las inmunorreacciones contra LDL oxidada pueden proteger contra el desarrollo, contribuyen al desarrollo de aterosclerosis y en absoluto tienen efecto dependiendo de sobre qué estructuras en LDL oxidada estén dirigidas. Estos hallazgos hacen posible desarrollar los procedimientos de inmunización, que aíslan la activación de inmunorreacciones protectoras. Además, muestran que la inmunización usando LDL oxidada intacta podría tener un efecto perjudicial si las partículas usadas contienen un alto nivel de estructuras que dan lugar a inmunorreacciones aterogénicas.

El documento WO 99/08109 se refiere al uso de un panel de anticuerpos monoclonales de ratón que se unen a partículas de LDL oxidada con el fin de determinar la presencia de LDL oxidada en suero y plasma. Por tanto, esto es totalmente diferente de la presente invención en la que se desvela un procedimiento para determinar anticuerpos contra LDL oxidada.

La patente de EE.UU. 4.970.144 se refiere a un procedimiento para preparar anticuerpos por medio de inmunización usando secuencias de péptidos cuyos anticuerpos pueden usarse para la determinación de apolipoproteínas usando

ELISA. Por tanto, esto es además algo bastante diferente de la presente invención.

La patente de EE.UU. 5.861.276 describe un anticuerpo recombinante para la forma normal de la apolipoproteína B. Este anticuerpo se usa para determinar la presencia de la apolipoproteína B normal en plasma y suero, y para tratar aterosclerosis reduciendo la cantidad de partículas de LDL normal en la circulación, contra el péptido de la invención

Por tanto, en la presente descripción se describe el uso de anticuerpos contra el péptido de la invención para tratar aterosclerosis. Sin embargo, a diferencia de la patente de EE.UU. 5.861.276, estos anticuerpos se dirigen a estructuras presentes en partículas de LDL oxidada y no a la partícula de LDL normal. La ventaja es que es la LDL oxidada, que se supone que da lugar al desarrollo de aterosclerosis. El uso de anticuerpos dirigidos a estructuras que son específicas para LDL oxidada no se describe en dicha patente de EE.UU.

El documento WO 98/42751 enumera fragmentos oxidados de la apolipoproteína B y su uso.

El documento WO 99/18986 enumera un procedimiento para inhibir la unión de lipoproteína de baja densidad a la matriz de vasos sanguíneos.

El documento WO 98/56938 enumera lipoproteínas como vectores de ácido nucleico.

Resumen de la invención

Se cree que la oxidación de lipoproteínas, principalmente LDL, en la pared arterial es un factor importante en el desarrollo de aterosclerosis. Los productos generados durante la oxidación de LDL son tóxicos para las células vasculares, producen inflamación e inician la formación de placas. Los epítopes en LDL oxidada son reconocidos por el sistema inmunitario y dan lugar a la formación de anticuerpos. Experimentos animales han mostrado que algunas de estas respuestas inmunitarias tienen un efecto protector contra la aterosclerosis. Los anticuerpos están generalmente casi exclusivamente dirigidos contra estructuras basadas en péptidos. Usando una biblioteca de polipéptidos que cubre la secuencia completa de la única proteína presente en LDL, la apolipoproteína B, los epítopes se han identificado en LDL oxidada que dan lugar a la formación de anticuerpos en el hombre. Estos epítopes de péptidos pueden usarse para desarrollar ELISA para estudiar asociaciones entre respuestas inmunitarias contra LDL oxidada y enfermedad cardiovascular y para desarrollar una inmunoterapia o "vacuna" antiaterosclerosis para la prevención y el tratamiento de enfermedad cardiovascular isquémica.

Descripción detallada de la invención

Se ha realizado una caracterización molecular de los epítopes en LDL oxidada que dan lugar a respuestas inmunitarias dependientes de anticuerpo en el hombre. El enfoque usado aprovecha el hecho de que las reacciones inmunitarias están dirigidas casi exclusivamente contra secuencias de péptidos de 5-6 aminoácidos de longitud. La LDL sólo contiene una proteína, la apolipoproteína B de 4563 aminoácidos de longitud. Durante la oxidación, la apolipoproteína B se fragmenta y aductos de aldehído se acoplan a aminoácidos positivamente cargados, en particular lisina. Esto significa que las secuencias de péptidos que normalmente no están expuestas debido a la estructura tridimensional de la apolipoproteína B se vuelven accesibles a células inmunitarias y/o que secuencias de péptidos normalmente expuestas se vuelven inmunogénicas debido a la haptización con aldehídos.

Así se ha determinado que anticuerpos producidos contra los siguientes péptidos, derivados nativos o de MDA poseen una eficiencia tal para producir una respuesta terapéutica o profiláctica, estos péptidos son

FLDVTYGNCSHTFTVKTRKG
 PQCSTHILQWLKRVHANPLL
 VISIPRLQAEARSEILAHWS
 KLVKEALKESQLPTVMDFRK
 LKFVTQAEGAKQTEATMTFK
 DGSLRHKFLDSNIKFSHVEK
 KGTYGLSCQRDPNTGRLNGE
 RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ
 SLTSTSDLQSGIINKNTASLK
 TASLKYENYELTLKSDTNGK
 DMTFSKQNALLRSEYQADYE
 MKVKIIRTIDQMENSELQWP
 IALDDAKINFNEKLSQLQTY
 KTTKQSFDSLVAQYKKNKH
 EEEMLENSLVCPKDATRFK
 GSTSHHLVSRKSISAALHVK
 IENIDFNKSGSSTASWIQNV
 IREVTQRLNGEIQALELPQK
 EVDVLTKEYSQPEDSLIPFFE

HTFLIYITELLKQLQSTTVM
 LLDIANYLMEQIQDDCTGDE
 CTGDEDYTYKIKRVIGNMGQ
 GNMGQTMELTPELKSSILK
 5 SSILKCVQSTKPSLMIQKAA
 IQKAAIQALRKMEPKDKDQE
 SLNSNGLELNADILGTDKIN
 WIQNVDTKYQIRIQIQEKLQ
 TYISDWWTLAAKNLDFAEQ
 10 EATLQRIYSLWEHSTKNHLQ
 ALLVPPETEEAKQVFLDTV
 IEIGLEGKGFEPTEALFGK
 SGASMKLTTNGRFREHNAKF
 NLIQDFEVAEKINAFRAKVH
 15 GHSVLTAKGMALFGEGKAEF
 FKSSVITLNTNAELFNQSDI
 FPDIGQEVALNANTKNQKIR

o un epítotope contenido en uno o más de estos péptidos.

Material y procedimientos

Para determinar qué partes de la apolipoproteína B se vuelven inmunogénicas como resultado de la oxidación de LDL se produjo una biblioteca de polipéptidos que consistía en péptidos de 20 aminoácidos de longitud que cubrían la secuencia de la apolipoproteína B humana completa. Los péptidos se produjeron con un solapamiento de 5 aminoácidos para cubrir todas las secuencias en puntos de ruptura. Se usaron péptidos en su estado nativo, o después de la incorporación en liposomas de fosfolípidos, después de la oxidación por exposición a cobre o después de la modificación con malondialdehído (MDA) para imitar las diferentes modificaciones de aminoácidos que pueden producirse durante la oxidación de LDL.

Péptidos

Se sintetizaron los 302 péptidos correspondientes a la secuencia de aminoácidos de la apolipoproteína B humana entera (Euro-Diagnostica AB, Malmö, Suecia, y KJ Ross Petersen AS, Horsholm, Dinamarca) y se usaron en ELISA. Una fracción de cada péptido sintético se modificó por MDA 0,5 M (Sigma-Aldrich Sweden AB, Estocolmo, Suecia) durante 3 h a 37°C y en presencia de liposomas por MDA 0,5 M durante 3 h a 37°C o por CuCl₂ 5 µM (Sigma) durante 18 h a 37°C. Los péptidos modificados por MDA se dializaron contra PBS que contenía EDTA 1 mM con varios cambios durante 18 h a 4°C. La modificación de los péptidos se probó en geles de poli(acrilamida) desnaturalizados (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) adecuados para la separación de péptidos. Los péptidos se numeraron 1-302 empezando en el extremo N de la proteína.

Pueden usarse otros aldehídos para preparar derivados, como hidroxinonenal y otros.

Liposomas

Una mezcla de fosfatidilcolina de huevo (EPC) (Sigma) y fosfatidilserina (PS) (Sigma) en una disolución de cloroformo a una relación molar de 9:1 y una concentración de fosfolípido 3 mM (PL) se evaporó en un recipiente de vidrio bajo corriente de argón moderada. Entonces, el recipiente se colocó a vacío durante 3 horas. Una disolución que contenía péptido 0,10 mM (5 ml) en tampón HEPES 10 mM esterilizado por filtración, pH 7,4, NaCl 145 mM y 0,003% de azida de sodio se añadió a la película secada de EPC/PS y se incubó durante 15 min a 50°C. La mezcla se agitó cuidadosamente con vórtex durante aproximadamente 5 min a temperatura ambiente y luego se colocó en un baño de agua fría en hielo y se sonicó con 7,5 micrómetros de amplitud durante 3 x 3 min (Sonyprep 150 MSE Sanyo, Tamro-Medlab, Suecia) con interrupciones de 1 min. La mezcla de PL-péptido, nativa o modificada por MDA 0,5 M durante 3 h a 37°C o por CuCl₂ 5 mM durante 18 h a 37°C, se almacenó bajo argón en viales de vidrio a 4°C envueltos en lámina de aluminio y se usaron en el transcurso de 1 semana. La mezcla modificada por MDA se dializó contra PBS que contenía EDTA 1 mM con varios cambios durante 18 h a 4°C antes del almacenamiento. La modificación de la mezcla se probó en geles de poli(acrilamida) desnaturalizados (Bio-Rad Laboratories AB, Sundbyberg, Suecia) adecuados para la separación de péptidos.

Muestras de plasma

Las muestras de plasma de 10 pacientes con enfermedad cardiovascular (AHP) y 50 muestras de plasma, 25 mujeres y 25 hombres, de donantes de sangre normales (NHP) se recogieron y se reunieron. Los dos conjuntos se separaron en alícuotas y se guardaron a -80°C.

ELISA

Los péptidos sintéticos nativos o modificados diluidos en PBS a pH 7,4 (20 µg/ml), en presencia o ausencia de liposomas, se absorbieron a pocillos de placas de microtitulación (Nunc MaxiSorp, Nunc, Roskilde, Dinamarca) en una incubación durante la noche a 4°C. Como referencia, uno de los péptidos (P6) se ejecutó sobre cada placa. Después de lavar con PBS que contenía 0,05% de Tween-20 (PBS-T), las placas recubiertas se bloquearon con SuperBlock en TBS (Pierce, Rockford, IL) durante 5 min a temperatura ambiente seguido de una incubación de plasma humano reunido, AHP o NHP, diluido 1/100 en TBS-0,05% de Tween-20 (TBS-T) durante 2 h a temperatura ambiente y luego durante la noche a 4°C. Después de aclararse, la deposición de autoanticuerpos dirigidos a los péptidos se detectó usando anticuerpos de conejo dirigidos contra IgG o IgM humana biotinilados (Dako A/S, Glostrup, Dinamarca) apropiadamente diluidos en TBS-T. Después de otra incubación durante 2 h a temperatura ambiente, las placas se lavaron y los anticuerpos biotinilados unidos se detectaron por estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma), se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. La reacción de color se desarrolló usando el kit de sustrato de fosfatasa (Pierce) y la absorbancia a 405 nm se midió después de 1 h de incubación a temperatura ambiente. Los valores de absorbancia de los diferentes péptidos se dividieron entre el valor de absorbancia de P6 y se compararon.

Las secuencias en la apolipoproteína B que fueron reconocidas por anticuerpos en plasma humano se muestran como SEC ID 1-36 en el dibujo adjunto. Tanto AHP como NHP contuvieron anticuerpos para un gran número de péptidos diferentes. Se identificaron anticuerpos contra péptidos tanto nativos como modificados. Generalmente, los títulos de anticuerpos para péptidos modificados por MDA fueron mayores o iguales a los del péptido nativo correspondiente. La comparación entre péptido nativos, modificados por MDA y oxidados con cobre mostró un alto grado de correlación y que los mayores títulos de anticuerpos se detectaron usando péptidos modificados por MDA. El uso de péptidos incorporados en liposomas no produjo un aumento de los niveles de anticuerpo. Los anticuerpos de la subclase IgM fueron más comunes que los anticuerpos del subtipo IgG.

Los péptidos contra los que se detectaron los mayores niveles de anticuerpos podrían dividirse en seis grupos con características comunes (Tabla 1):

- (A) Altos niveles de anticuerpos IgG para péptidos modificados por MDA (n=3).
 (B) Altos niveles de anticuerpos IgM, pero sin diferencia entre péptidos nativos y modificados por MDA (n=9).
 (C) Altos niveles de anticuerpos IgG, pero sin diferencia entre péptidos nativos y modificados por MDA (n=2).
 (D) Altos niveles de anticuerpos IgG para péptidos modificados por MDA y al menos el doble de anticuerpos en el conjunto de NHP con respecto al conjunto de AHP (n=5).
 (E) Altos niveles de anticuerpos IgM para péptidos modificados por MDA y al menos el doble de anticuerpos en el conjunto de NHP con respecto al conjunto de AHP (n=10).
 (F) Altos niveles de anticuerpos IgG, pero sin diferencia entre péptidos intactos y modificados por MDA, pero al menos el doble de anticuerpos en el conjunto de AHP con respecto al conjunto de NHP (n=7).

Tabla 1

A. IgG alta, diferencia por MDA

<u>P 11.</u>	<u>FLDVTYGNCSHFVTKTRKG</u>
<u>P 25.</u>	<u>PQCSTHILQWLKRVHANPLL</u>
<u>P 74.</u>	<u>VISIPRLQAEARSEILAHWS</u>

B. IgM alta, sin diferencia por MDA

<u>P 40.</u>	<u>KLVKEALKESQLPTVMDFRK</u>
<u>P 68.</u>	<u>LKFVTQAEGAKQTEATMTFK</u>
<u>P 94.</u>	<u>DGSLRHKFLDSNIKFSHVEK</u>
<u>P 99.</u>	<u>KGTYGLSCQRPNTGRLNGE</u>
<u>P 100.</u>	<u>RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ</u>
<u>P 102.</u>	<u>SLTSTSDLQSGIIKNTASLK</u>
<u>P 103.</u>	<u>TASLKYENYELTLKSDTNGK</u>
<u>P 105.</u>	<u>DMTFSKQNALLRSEYQADYE</u>
<u>P 177.</u>	<u>MKVKIIRTIDQMQNSELQWP</u>

C. IgG alta, sin diferencia por MDAP 143. IALDDAKINFNEKLSQLQTYP 210. KTTKQSFDSLVSQAQYKKNKH**D. NHS/AHP, IgG-ak > 2, diferencia por MDA**P1. EEEMLENVSLVCPKDTRFKP 129. GSTSHHLVSRKSISAALCHKP 148. IENIDFNKSGSSTASWIQNVP 162. IREVTQRLNGEIQALELPQKP 252. EVDVLTKYSPEDSLIPFFE**E. NHS/AHP, IgM-ak > 2, diferencia por MDA**P 301. HTFLIYITELLKKLQSTTVMP 30. LLDIANYLMEQIQDDCTGDEP 31. CTGDEDYTYKIKRVIGNMGQP 32. GNMGQTMEQLTPELKSSILKP 33. SSILKCVQSTKPSLMIQKAAP 34. IQKAAIQALRKMEPKDKDQEP 107. SLNSHGLELNADILGTDKINP 149. WIQNVDTKYQIRIQIEKIQP 169. TYISDWWTLAAKNLTDFAEQP 236. EATLQRIYSLWEHSTKNHLQ**F. NHS/AHP, IgG-ak < 0,5, sin diferencia por MDA**P 10. ALLVPPETEEAKQVFLDVTP 45. IEIGLEGKGFEPTEALFGKP 111. SGASMKLTTNGRFREHNAKFP 154. NLIGDFEVAEKINAFRAKVHP 199. GHSVLTAKGMALFGGKAEFP 222. FKSSVITLNTNAELFNQSDIP 240. FPDLGQEVALNANTKNQKIR

5 Todas estas 36 secuencias de péptidos representan dianas para reacciones inmunitarias que pueden ser de importancia para el desarrollo de aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares isquémicas. Por tanto, estos péptidos pueden usarse para desarrollar ELISA para determinar las asociaciones entre niveles de anticuerpos contra secuencias definidas de aminoácidos modificados por MDA en la apolipoproteína B y el riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular.

10 Estos péptidos también representan posibles mediadores de la inmunidad protectora observada en animales experimentales inmunizados con LDL oxidada y pueden usarse para probar el desarrollo adicional de una terapia de inmunización o "vacuna" contra la aterosclerosis.

15 Por tanto, se han identificado 36 secuencias diferentes en la proteína de la apolipoproteína B humana que dan lugar a respuestas inmunitarias significativas en el hombre. Es probable que estos epítipes representen lo que previamente se ha descrito como anticuerpos para LDL oxidada. Como la mayoría de las respuestas inmunitarias están dirigidas contra secuencias de péptidos y la apolipoproteína B es la única proteína en LDL, el enfoque usado en este proyecto debería ser poder identificar los epítipes específicos para esencialmente todos los anticuerpos contra partículas de LDL oxidada. Se ha descrito una familia de anticuerpos específicos de fosfolípidos que incluyen anticuerpos contra cardiolipina que reacciona con LDL oxidada, pero la especificidad y la función de estos anticuerpos queda por caracterizarse completamente.

20

En muchos casos, los títulos de anticuerpos fueron mayores para polipéptidos modificados por MDA que para secuencias nativas. Si los anticuerpos se detectaron contra una secuencia modificada por MDA, casi siempre estuvo asociado a la presencia de anticuerpos contra la secuencia nativa. Una explicación posible para esto es que la

respuesta inmunitaria contra una secuencia de aminoácidos modificada por MDA en la apolipoproteína B (la modificación por MDA que se produce como resultado de la oxidación de LDL) conduce a una ruptura de la tolerancia contra la secuencia nativa. Para otras secuencias no hubo diferencia en títulos de anticuerpos contra secuencias modificadas por MDA o nativas. Esto sugeriría que las reacciones inmunitarias están dirigidas contra las secuencias nativas. No debería haber respuesta inmunitaria contra secuencias de aminoácidos en proteína normalmente expuesta al sistema inmunitario. En la partícula de LDL nativa, grandes partes de la proteína de la apolipoproteína B están escondidas en la capa de fosfolípidos de LDL y, por tanto, no son accesibles para el sistema inmunitario. Durante la oxidación de LDL, la cadena de aminoácidos de la apolipoproteína B se fragmenta conduciendo a cambios en la estructura tridimensional. Es probable que esto conduzca a la exposición de secuencias de péptidos normalmente no accesibles para el sistema inmunitario y a la generación de anticuerpos contra estas secuencias que pueden explicar la presencia de anticuerpos contra secuencias de la apolipoproteína B nativa. Alternativamente, la respuesta inmunitaria verdadera es contra secuencias modificadas por MDA, pero la reactividad cruzada con secuencias nativas es tan grande que no puede demostrarse diferencia en la unión.

Tabla 2.

Asociaciones entre anticuerpos para diferentes péptidos y aterosclerosis en la arteria carótida evaluado como espesor de la íntima/media en 78 sujetos (26 sujetos que posteriormente desarrollaron infarto de miocardio, 26 controles sanos y 26 individuos de alto riesgo con enfermedad).

Péptido	IgG		IgM	
	Nativo	Modificado por MDA	Nativo	Modificado por MDA
301				+
10			+	+
11			++	+
25	+	+	++	+++
30				++
31			++	++
32				++
33				+
34				+
45		++	++	+++
74	++	+	+	++
99				
100			+	++
102				++
103			+	
105				
129			++	+++
143	+	+	++	+
148				+
154			+++	++
162			+	++
199				
210			+	
240			++	++

+, $r > 0,2 < 0,3$, $p = < 0,05$; ++, $r > 0,3 < 0,4$, $p = 0,01$; +++, $r > 0,4$, $p = < 0,001$, gris, niveles de anticuerpos de péptido significativamente elevados en el grupo que padece infarto de miocardio.

La posibilidad de que puedan usarse ELISA basados en estos péptidos (nativos o modificados por MDA) para

determinar asociaciones entre inmunorreacción contra epítipes definidos en LDL oxidada y presencia y/o riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular se investigó en un estudio piloto. El estudio se realizó en sujetos que participaban en el Estudio de dieta y cáncer de Malmö, un estudio basado en población en el que más de 30.000 individuos se reclutaron entre 1989 y 1993. Los niveles de anticuerpos contra 24 de los 36 péptidos enumerados en la Tabla 1 se determinaron en muestras de plasma de referencia de 26 sujetos que desarrollaron un infarto de miocardio agudo durante el periodo de seguimiento y 26 controles sanos de la misma edad, sexo y tabaquismo. También se incluyó un grupo adicional de 26 sujetos, de la misma edad, sexo y tabaquismo, pero todos con niveles de colesterol LDL por encima de 5,0 mmol/l para estudiar niveles de anticuerpos en un grupo de alto riesgo que no ha desarrollado enfermedad cardiovascular.

Para 19 de los 24 péptidos analizados se identificaron correlaciones significativas entre niveles de anticuerpos IgM contra péptidos modificados por MDA y la gravedad de aterosclerosis en la arteria carótida (espesor de la íntima/media) como se evalúa por investigación ultrasónica de la arteria carótida común, es decir, cuanto mayores sean los niveles de anticuerpos, mayor será la aterosclerosis (Tabla ?). Para muchos de estos péptidos también existieron correlaciones significativas entre niveles de anticuerpos para péptidos nativos y espesor de la íntima/media de la carótida. Sólo 4 péptidos mostraron una correlación significativa entre anticuerpos IgG y el espesor de la íntima/media de la carótida. Estas observaciones sugieren que los ELISA usando estos péptidos modificados por MDA (solos o en combinación) pueden usarse para identificar sujetos con aumento de aterosclerosis.

Cuatro de los péptidos probados estuvieron no sólo asociados a un aumento de la presencia de aterosclerosis, sino que también fueron significativamente elevados en el grupo de sujetos que posteriormente sufrieron un infarto de miocardio (Tabla 2). Los datos para uno de estos péptidos (péptido 240) se muestran en la Fig. 7. Estas observaciones también demuestran que el ELISA basado en péptidos también puede usarse para identificar sujetos con un riesgo elevado de desarrollar infarto de miocardio.

También hubo aumentos significativos en los niveles de anticuerpos IgG para los péptidos nativos 103, 162 y 199, además de 102 modificado por MDA en el grupo que posteriormente sufrió infarto de miocardio. Sin embargo, los anticuerpos IgG contra estos péptidos no estuvieron significativamente asociados a la presencia de aterosclerosis en la arteria carótida.

Se hizo una observación particularmente interesante con anticuerpos contra el péptido 210 modificado por MDA para el que hubo niveles de anticuerpos IgM significativamente mayores en los controles sanos y el grupo de alto riesgo (colesterol LDL por encima de 5,0 mmol/l) que en el grupo que desarrolló un infarto de miocardio. Por consiguiente, los anticuerpos contra el péptido 210 modificado por MDA pueden representar un marcador para individuos con una disminución del riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular.

Se ha demostrado ahora que la inmunización con secuencias de péptidos de apo B-100 nativas y modificadas por MDA produce una inhibición de la aterosclerosis en animales experimentales (Nordin Fredrikson, Söderberg y col., Chyu y col.). Los mecanismos por los que estas respuestas inmunitarias atero-protectoras operan siguen estando por elucidar completamente. Sin embargo, una posibilidad probable es que el efecto atero-protector esté mediado por anticuerpos generados contra estas secuencias de péptidos. Estos anticuerpos podrían facilitar, por ejemplo, la eliminación de partículas de LDL oxidativamente lesionadas por receptores Fc de macrófagos.

Los receptores de eliminadores de macrófagos sólo reconocen LDL con lesión oxidativa extensa (9). Estudios recientes han identificado la existencia de LDL oxidada en circulación (10,11). Estas partículas solo tienen una lesión oxidativa mínima y no son reconocidas por receptores de eliminadores. La unión de anticuerpos a estas partículas de LDL oxidada en circulación puede ayudar a eliminarlas de la circulación antes de que se acumulen en el tejido vascular (12).

Varios estudios han apoyado una función de los anticuerpos en la protección contra la aterosclerosis. La reconstitución de linfocitos B inhibe el desarrollo de aterosclerosis en ratones nulos para apo E esplenectomizados (13), además de la formación de neoíntima después de lesión de la carótida en ratones RAG-1 (observaciones sin publicar del laboratorio de los inventores). Además, se ha mostrado que inyecciones repetidas de inmunoglobulinas reducen la aterosclerosis en ratones nulos para apo E (6).

Como se trata anteriormente, los anticuerpos contra secuencias de péptidos modificadas por MDA en apo B-100 pueden generarse por inmunización activa usando péptidos sintéticos. Este procedimiento requiere 2-3 semanas antes de que se obtenga un efecto completo sobre la producción de anticuerpos.

En algunas situaciones puede necesitarse un efecto más rápido. Un ejemplo puede ser placas ateroscleróticas inestables en las que es probable que la LDL contribuya a la toxicidad de células pulmonares y a riesgo de rotura de placas. Bajo estas circunstancias, una inmunización pasiva mediante inyección de anticuerpos purificados o recombinantemente producidos contra secuencias nativas y modificadas por MDA puede tener un efecto más rápido.

Otra situación en la que puede ser eficaz una inmunización pasiva mediante inyección de anticuerpos purificados o

recombinantemente producidos es enfermedad cardiaca coronaria en individuos ancianos. Los estudios de los inventores han mostrado que una disminución en los anticuerpos contra secuencias de péptidos de apo B se produce con un aumento en la edad en el hombre y está asociado a un aumento en el nivel de plasma de LDL oxidada (Nordin Fredrikson, Hedblad y col.). Esto puede sugerir una senescencia de las células inmunitarias responsables de la producción de anticuerpos contra antígenos en LDL oxidada y producir una eliminación defectuosa de partículas de LDL oxidativamente lesionadas de la circulación. Por consiguiente, estos sujetos se beneficiarían más de una inmunización pasiva mediante inyección de anticuerpos purificados o recombinantemente producidos que de una inmunización activa con secuencias de péptidos de apo B-100.

Los péptidos nativos sintéticos (Euro-Diagnostica AB, Malmö, Suecia) usados a continuación fueron el péptido 1, 2 y 301 de la biblioteca de polipéptidos inicialmente cribada.

Se encontró que el péptido 1 (secuencia de aminoácidos: EEEMLENVSLVCPKDTRFK, n=10) y el péptido 301 (secuencia de aminoácidos: HTFLIYITELLKQLQSTTVM, n=10) tenían una mayor respuesta de anticuerpos IgG o IgM a la forma modificada por MDA que el péptido nativo, respectivamente, y ambos títulos son mayores en el sujeto sano. Estos péptidos se eligieron basándose en la suposición de que la respuesta de anticuerpos a estos péptidos podría ser protectora contra la aterosclerosis.

El péptido 2 (secuencia de aminoácidos: ATRFKHLRKYTYNYQAQSSS, n=10) no provocó respuesta de anticuerpos en el cribado de anticuerpos inicial, de ahí que se eligiera como péptido de control. Los ratones que recibieron alumbre sirvieron de control (n=9).

Los ratones apo E (-/-) recibieron inmunización primaria subcutánea a las 6-7 semanas de edad, seguido de un refuerzo intraperitoneal 3 semanas después. Los ratones se alimentaron con una dieta rica en colesterol desde el comienzo de la inmunización y continuó hasta el sacrificio a la edad de 25 semanas. En el momento del sacrificio no hubo diferencia significativa en el peso corporal entre los 4 grupos de ratones. Ni hubo diferencia estadísticamente significativa en el colesterol en suero como se mide usando un kit comercialmente disponible (Sigma). Los niveles medios de colesterol en el suero estuvieron todos por encima de 715 mg/dl.

El área de la aorta descendente cubierta por la placa aterosclerótica se midió en una preparación *en face* después de la tinción con Oil red O. En comparación con el grupo de control, los ratones inmunizados con el péptido nº 2 y nº 301 tuvieron aterosclerosis sustancialmente reducida. La inmunización con el péptido nº 1 no produjo una reducción significativa en la aterosclerosis en comparación con el control. A diferencia de la aorta descendente, el grado de aterosclerosis en la raíz aórtica y el arco aórtico no se diferenció entre los 4 grupos experimentales.

No hubo diferencia entre los 4 grupos en términos de tamaño de placas del seno aórtico o su contenido de lípidos (Tabla A). Los tamaños de placa medios en los arcos aórticos de los 4 grupos de ratones no fueron diferentes. Sin embargo, la evaluación *en face* de los tamaños de placas de la aorta torácica descendente y abdominal por tinción por Oil red O reveló que el grupo de control y el grupo del péptido nº 1 tuvieron cantidad similar de placa aterosclerótica en la aorta, mientras que los grupos del péptido nº 2 y nº 301 tuvieron una carga aterosclerótica significativamente reducida en la aorta (Tabla A). La observación de que la inmunización con péptidos no afectó el tamaño de placas del seno aórtico o arco aórtico, pero redujo la placa aórtica descendente, es interesante y sugiere que la inmunización de péptidos podría reducir la formación de nuevas placas, pero no afecta la progresión de placas.

Se probó adicionalmente si la inmunización de péptidos modulaba el fenotipo de placas ateroscleróticas. Secciones congeladas de placas del seno aórtico se tiñeron inmunohistoquímicamente con anticuerpo de monocitos/macrófagos (MOMA-2, Serotec). De acuerdo con los hallazgos de la observación *en face*, el péptido nº 2 redujo significativamente la infiltración de macrófagos en las placas (Figura 1). La tinción con tricromo reveló un contenido de colágeno medio del $40,0 \pm 7,7\%$ en las placas del seno aórtico del grupo de péptidos 2; mientras que el contenido de colágeno medio en el grupo de control de alumbre, grupo de péptidos 1 y grupo de péptidos 301 fueron $32,3 \pm 5,3\%$, $35,6 \pm 8,5\%$ y $29,4 \pm 9,6\%$, respectivamente.

Se determinó la respuesta de anticuerpos contra péptido inmunizado en cada grupo. El título de anticuerpos después de la inmunización aumentó $6,1 \pm 3,1$ veces en el grupo de péptidos 1, $2,4 \pm 1,0$ veces en el grupo de péptidos 2 y $1,8 \pm 0,6$ veces en el grupo de péptidos 9; mientras que el grupo de alumbre tuvo un aumento de $3,9 \pm 2,7$ veces el título de anticuerpos contra el péptido 1, aumento de $2,0 \pm 0,5$ veces contra el péptido 2 y aumento de $2,0 \pm 0,9$ veces contra el péptido 9. Es sorprendente el aumento en paralelo del título de anticuerpos contra péptidos inmunizados tanto en el grupo inmunizado como el tratado con alumbre. Esto puede significar las siguientes posibilidades; (1) mecanismo(s) distinto(s) de respuesta inmunitaria humoral (tal como respuesta inmunitaria celular) puede(n) participar en la modulación de aterosclerosis; o (2) este aumento de anticuerpo fue una respuesta inocente a hipercolesterolemia con el tiempo.

Aunque no hay un mecanismo especulativo claro para explicar por qué la inmunización de péptidos redujo la aterosclerosis y/o modula el fenotipo de placas, la novedad de la presente invención es el concepto de usar péptidos de LDL como inmunógeno y su viabilidad como estrategia de inmunomodulación. Esta estrategia de inmunización basada en péptidos modula las placas ateroscleróticas. Se había mostrado que la inmunización usando oxLDL homólogo o LDL nativa como antígeno redujo el tamaño de placas¹⁻³ sin embargo, la disponibilidad, producción,

contaminación infecciosa y seguridad de LDL humana homóloga hace que este enfoque sea poco llamativo para la aplicación clínica. Aquí se demuestra que la inmunoterapia basada en péptidos es factible, aunque los resultados finales de los inventores se diferencien de sus hipótesis iniciales de que la inmunización usando péptidos con mayor respuesta de anticuerpos IgM o IgG en sujetos normales puede proteger a animales experimentales del desarrollo de placas ateroscleróticas avanzadas.

Es sorprendente encontrar que la inmunización usando el péptido nº 2 protegió al animal del desarrollo de nuevas lesiones ateroscleróticas en la aorta descendente y redujo la infiltración de macrófagos y un mayor contenido de colágeno en placas ya que este péptido no convirtió ninguna respuesta de anticuerpo del cribado humano inicial. Puede ser debido (a) el péptido nº 2 puede ser una parte de la estructura de la proteína de apo-B-100 humana que no se expuso al sistema inmunitario humano. De ahí que no se generara anticuerpo y se detectara a partir de conjuntos de suero humano sano; (b) la secuencia de aminoácidos del péptido nº 2 es exógena para ratones, por tanto, los ratones desarrollaron respuesta inmunitaria contra este péptido, que modula la nueva formación de lesiones ateroscleróticas y su fenotipo.

El efecto de la inmunización con LDL homóloga sobre el tamaño de placas varió cuando los tamaños de placas se evaluaron en diferentes porciones del árbol aórtico. Por ejemplo, Ameli y col. mostraron en conejo hipercolesterolémico que la inmunización con LDL nativa produjo una reducción de la formación de placas en aorta¹, mientras que Freigang y col. mostraron la reducción del tamaño de placas en seno aórtico, pero no en aorta². Considerando juntos sus hallazgos y los presentes se especuló que la inmunización de péptidos modula no sólo los tamaños de placas, sino también la composición de placas. El efecto reductor de placas sólo se observó en la aorta descendente. Los ratones apo E (-/-) son conocidos por desarrollar lesiones ateroscleróticas en diversas etapas de evolución en un animal individual, especialmente cuando se alimentaron con dieta rica en colesterol. El aspecto inicial de la lesión aterosclerótica en animal joven fue en el seno aórtico^{6,7} y después de 15 semanas con dieta rica en grasa y rica en colesterol las lesiones en el seno aórtico fueron placas avanzadas; mientras que el estado previo de la aterosclerosis estaba presente en aorta descendente.⁶ Como el transcurso temporal de la maduración de placas y el desarrollo en la aorta descendente es tardío en comparación con el del seno aórtico, el hallazgo de que la inmunización redujo los tamaños de lesión en la aorta descendente, pero no en el seno aórtico, sugirió que la inmunización afectaba la etapa temprana de la formación de la aterosclerosis. Es posible que a medida que el animal envejece y en presencia de nivel suprafisiológico de colesterol en suero, el efecto reductor de placas de la inmunización sea vencido por el efecto tóxico de la hipercolesterolemia. También es posible que las placas del seno aórtico maduren más rápido y el sacrificio a las 25 semanas sea demasiado tarde para detectar cualquier diferencia en el tamaño de placas. Aunque el tamaño de lesión no se moduló en la placa del seno aórtico, la inmunización de péptidos moduló las composiciones de placas. El presente diseño experimental impidió el estudio de la composición de las placas en su estado más temprano de desarrollo en aorta descendente.

Los hallazgos experimentales destacan la viabilidad de usar secuencias de péptidos de LDL asociada a apo B-100 como inmunógenos para un enfoque novedoso para prevenir aterosclerosis y o modular favorablemente el fenotipo de placas a pesar de hiperlipidemia grave. Esta estrategia de inmunización basada en péptidos es potencialmente ventajosa con respecto al uso de oxLDL homóloga o LDL nativa como antígeno debido a que una estrategia tal podría eliminar la necesidad de aislamiento y preparación de LDL homóloga y el riesgo de contaminación que conlleva. El efecto de inmunización reductor de placas con el péptido nº 2 y 301 sólo se observó en aorta descendente. Estos hallazgos están de acuerdo con informes previos en los que también se ha mostrado que otras intervenciones terapéuticas tienen un mayor efecto sobre la aorta descendente en comparación con el arco aórtico¹⁴⁻¹⁷, supuestamente debido a que las lesiones se desarrollan más rápidamente en la raíz y arco aórtico que en la aorta descendente, creándose así una ventana más pequeña de oportunidad para la intervención^{14, 15, 16, 18, 19}. Como el transcurso temporal de la maduración y el desarrollo de placas en la aorta descendente es tardío en comparación con el del seno aórtico y el arco aórtico, el hallazgo de que la inmunización redujo los tamaños de lesión en la aorta descendente, pero no en el seno y arco aórtico, sugiere que la inmunización evita preferencialmente la etapa temprana de la formación de aterosclerosis. Es posible que a medida que el animal envejece y en presencia de nivel suprafisiológico de colesterol en suero se supere el efecto de inmunización reductor de placas por el efecto tóxico de la hipercolesterolemia grave. Aunque el tamaño de lesión no se moduló en el seno o arco aórtico, la inmunización con péptido nº 2 moduló la composición de placas en una dirección favorable creando un fenotipo de placas más estable con infiltración de macrófagos reducida y aumento del contenido de colágeno. En resumen, se demuestra un novedoso enfoque inmunomodulador basado en péptidos para la inhibición de aterosclerosis en el modelo murino.

En resumen, se demuestra un novedoso enfoque inmunomodulador basado en péptidos en la modulación de placas ateroscleróticas. Aunque el cambio en la formación de aterosclerosis en el modelo de los inventores sólo fue modesto, esta inmunización basada en péptidos todavía puede proporcionar una herramienta alternativa en el estudio, prevención o tratamiento de aterosclerosis.

Procedimientos

Preparación de péptidos. Los péptidos se prepararon usando el kit Imject® SuperCarrier® EDC (Pierce, Rockford, IL) según la instrucción del fabricante con modificación menor. Un mg de péptido en 500 µl de tampón de conjugación se mezcló con 2 mg de vehículo en 200 µl de agua desionizada. Esta mezcla se incubó entonces con 1 mg de

reactivo de conjugación (EDC, HCl de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida) a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego se dializó contra disolución de fosfato de sodio 0,083 M, cloruro sódico 0,9 M a pH 7,2 durante la noche a 4°C. El conjugado dializado se diluyó con el tampón de purificación en mezcla seca Imject a un volumen final de 1,5 ml. Se usó alumbre como inmunoadyuvante y se mezcló con conjugado de péptido con dilución 1:1 en volumen. La cantidad de péptido en cada inmunización fue 33 µg/100 µl por inyección.

Protocolo de animales. Ratones apo E (-/-) de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Me) recibieron inmunización primaria subcutánea a las 6-7 semanas de edad, seguido de un refuerzo intraperitoneal 3 semanas después. Los ratones se alimentaron con una dieta rica en colesterol desde el comienzo de la inmunización y continuó hasta el sacrificio a la edad de 25 semanas. Se recogieron muestras de sangre 2 semanas después del refuerzo y en el momento del sacrificio. Los ratones que recibieron alumbre sirvieron de control. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité institución del cuidado y uso de animales del Centro médico Cedars-Sinai. Todos los ratones se alojaron en un animalario acreditado por la Asociación americana de acreditación del cuidado de animales de laboratorio y se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de día/noche y tuvieron acceso ilimitado a agua y comida. En el momento del sacrificio, los ratones se anestesiaron por inhalación de enflurano. Se obtuvo plasma por sangrado retro-orbital antes del sacrificio.

Recogida y seccionamiento de tejido. Para evaluar el efecto de la inmunización de péptidos sobre la formación de aterosclerosis se evaluó el tamaño de placas en el seno aórtico, arco aórtico y la aorta torácica descendente y abdominal. Después de que el corazón y el árbol aórtico se perfundieran con solución salina normal a presión fisiológica, el corazón y la aorta proximal se escindieron y se incorporaron en compuesto de OCT (Tissue-Tek) y se congelaron seccionados. Las secciones seriadas de 6 µm se recogieron a partir de la aparición de al menos 2 válvulas aórticas hasta la desaparición de las valvas de las válvulas aórticas para la evaluación de las placas del seno aórtico. Normalmente, 3 secciones consecutivas estuvieron en un portaobjetos y se recogieron un total de 25-30 portaobjetos de un ratón y cada quinto portaobjetos se agrupó para la tinción. La aorta ascendente y los arcos aórticos hasta la arteria subclavia izquierda también se seccionaron y se procesaron similarmente. La aorta torácica descendente y abdominal se procesaron por separado para la evaluación *en face* de la formación de placas después de la tinción con Oil red O. Preparación *en face* de la aorta torácica descendente y abdominal

Albúmina de huevo de pollito (Sigma) en una concentración de 0,8 g/ml de agua se mezcló 1:1 con glicerina. Se añadió azida de sodio para preparar una concentración final de azida de sodio del 0,2%. Entonces, después de limpiar la aorta torácica descendente y abdominal de tejido de alrededor y de grasa, se extirpó cuidadosamente el segmento de aorta de la arteria subclavia izquierda hasta el nivel de la arteria renal para la fijación durante la noche en Histochoice (Amresco). Entonces, la aorta se abrió cuidadosamente longitudinalmente y se colocó con la cara luminal hacia arriba sobre un portaobjetos recientemente recubierto de disolución de albúmina de huevo. Después de secarse la disolución de albúmina, la aorta se tiñó con Oil red O para evaluar el grado de aterosclerosis con histomorfometría asistida por ordenador.

Inmunohistoquímica e histomorfometría. Las secciones del seno aórtico se tiñeron inmunohistoquímicamente con anticuerpo MOMA-2 (Serotec) usando un protocolo estándar. La tinción con tricromo para evaluar el contenido de colágeno y la tinción con Oil red O para el tamaño de placas y el contenido de lípidos se hicieron usando un protocolo de tinción convencional. El análisis morfométrico asistido por ordenador se realizó para evaluar la histomorfometría como se ha descrito previamente.⁸

Medición del título de anticuerpos. Se desarrolló un ELISA para medir la respuesta de anticuerpos después de la inmunización de péptidos. El título de anticuerpos contra péptido inmunizado se midió usando sangre recogida 2 semanas después del refuerzo y en el sacrificio. La respuesta de anticuerpos contra 3 péptidos también se determinó en el grupo de alumbre a los mismos momentos de tiempo. En resumen, péptidos sintéticos nativos diluidos en PBS a pH 7,4 (20 µg/ml) se absorbieron a pocillos de placas de microtitulación (Nunc MaxiSorp, Nunc, Roskilde, Dinamarca) en una incubación durante la noche a 4°C. Después de lavar con PBS que contenía 0,05% de Tween-20 (PBS-T), las placas recubiertas se bloquearon con SuperBlock en TBS (Pierce) durante 5 min a temperatura ambiente, seguido de una incubación de suero de ratón diluido 1/50 en TBS-0,05% de Tween-20 (TBS-T) durante 2 h a temperatura ambiente y luego durante la noche a 4°C. Después del aclarado, la deposición de anticuerpos dirigida a los péptidos se detectó usando anticuerpos de conejo dirigidos contra Ig de ratón biotinilados (Dako A/S, Glostrup, Dinamarca) apropiadamente diluidos en TBS-T. Después de otra incubación durante 2 h a temperatura ambiente, las placas se lavaron y los anticuerpos biotinilados unidos se detectaron por estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma), se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. La reacción de color se desarrolló usando el kit de sustrato de fosfatasa (Pierce) y la absorbancia a 405 nm se midió después de 1 h de incubación a temperatura ambiente. Los valores medios se calcularon después de restarse el fondo.

Por supuesto también son aplicables otros modelos de ensayo tales como cualquier inmunoensayo que detecte un anticuerpo tal como inmunoensayo radiactivo, transferencia Western y transferencia Southern, además de detección de anticuerpos unidos a péptidos, electrodos de enzimas y otros procedimientos para análisis.

Estadística

Los datos se presentan como media \pm DE. El procedimiento estadístico usado se enumera en el siguiente texto, leyenda de la tabla o de la figura. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Tabla A Tamaño de placas del seno aórtico y su contenido de lípidos, tamaño de placas del arco aórtico y porcentaje de placa en aorta descendente.

	Tamaño total de placas en seno aórtico (mm ²)	Área de Oil red O (+) (% de placa de seno aórtico)	Tamaño de placas del arco aórtico (mm ²)	% de placa en aorta (prep. plana)
Alarma	0,49 \pm 0,13	21,7 \pm 4,4	0,057 \pm 0,040	20 \pm 4,7
Péptido 1	0,48 \pm 0,14	32,0 \pm 8,1	0,054 \pm 0,027	17 \pm 4,3
Péptido 301	0,46 \pm 0,16	23,8 \pm 4,1	0,050 \pm 0,024	8,9 \pm 2,2*

*Significativamente diferente del grupo de alumbre. Se usó ANOVA seguida de la prueba de Tukey-Kramer para el análisis estadístico.

A continuación se facilita en la Tabla B otros datos sobre el efecto de la inmunización con secuencias de péptidos de la apolipoproteína B-100 sobre la aterosclerosis en ratones de genes inactivados apo E.

10

Tabla B

Efecto de la inmunización con secuencias de péptidos de la apolipoproteína B-100 sobre la aterosclerosis en ratones de genes inactivados apo E

Inmunizaciones usando mezclas de varias secuencias de péptidos

Efecto sobre la aterosclerosis en la aorta

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

Inmunizaciones usando una única secuencia de péptidos

1. Secuencia de péptidos 210	-57,9%
2. Secuencia de péptidos 301	-55,2%
3. Secuencia de péptidos 45	-47,4%
4. Secuencia de péptidos 74	-31,0%
5. Secuencia de péptidos 1	-15,4%
6. Secuencia de péptidos 240	

15

La administración de los péptidos anteriores que comprenden un péptido p45 de la invención y otros péptidos se lleva normalmente a cabo mediante inyección tal como inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular o inyección intraperitoneal. Una primera dosificación inmunizante puede ser 1 a 100 mg por paciente dependiendo del peso corporal, edad y otras condiciones físicas y mediales. En situaciones particulares también es posible una administración local de una disolución que contiene uno o más del péptido de la invención y otros péptidos mediante catéter a los vasos coronarios. También pueden prepararse preparaciones orales, aunque deben tomarse precauciones de la invención particular para admitir la absorción en la circulación sanguínea. Una dosificación en inyección puede contener del 0,5 al 99,5% en peso de uno o más de los péptidos de la presente invención. Los péptidos anteriores que comprenden un péptido p45 de la invención y otros péptidos se administran normalmente como ligados a albúmina de suero bovino cationizada y usando hidróxido de aluminio como adyuvante. También pueden usarse otros adyuvantes conocidos en la técnica.

20

25 Las disoluciones para administración de los péptidos no deben contener ni EDTA ni antioxidante, de la invención

El péptido también puede usarse como agente terapéutico en pacientes que ya padecen una aterosclerosis. Por tanto, puede usarse cualquier vía de administración adecuada para añadir uno o más de los péptidos de la invención

y otros péptidos.

Estudios iniciales se basaron en la determinación de qué tipo de modificaciones oxidativas de péptidos condujeron al reconocimiento por anticuerpos en plasma humano. Estos estudios se hicieron usando péptidos i-5 y 297-302. Durante la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de LDL en fosfolípidos y ésteres de colesterol se experimenta la peroxidación que conduce a la formación de productos de descomposición altamente reactivos tales como malondialdehído (MDA). El MDA puede entonces formar aductos covalentes con residuos de lisina y histidina en apo B-100 haciendo que sean altamente inmunógenos. La oxidación de LDL también produce la fragmentación de apo B-100 que puede conducir a la exposición de secuencias de péptidos normalmente no accesibles para el sistema inmunitario. En estos experimentos, los péptidos se usaron en su estado nativo, después de la modificación por MDA o después de la incorporación en liposomas de fosfolípido seguido de oxidación con cobre o modificación por MDA. Los anticuerpos IgM se identificaron contra péptidos nativos, por MDA y oxidados con liposomas con títulos de anticuerpos MDA-péptido > péptidos de liposoma modificados por MDA > péptido oxidado con liposomas > péptido nativo. Las pruebas de especificidad demostraron que la unión de anticuerpos a péptidos modificados por MDA era competida tanto por MDA-LDL como por LDL oxidada con cobre.

Entonces, los inventores realizaron un cribado de la biblioteca de péptidos completa usando plasma reunido derivado de sujetos de control sanos y péptidos nativos y modificados por MDA como antígenos. Se identificaron anticuerpos para un gran número de sitios en apo B-100. Usando dos veces la absorbancia del control de fondo como corte de título positivo, los anticuerpos se detectaron contra 102 de los 302 péptidos que constituían la secuencia de apo B-100 completa. La unión de IgM fue sustancialmente más abundante que la de IgG. Generalmente, la unión fue superior a secuencias de péptidos modificadas por MDA que a la secuencia nativa correspondiente, pero esto fue una correlación sorprendente entre los dos. La unión a tanto secuencias nativas como modificadas por MDA fue competida por la adición de LDL modificada por MDA y LDL oxidada con cobre, pero no por LDL nativa. Estas observaciones sugieren que las respuestas inmunitarias contra secuencias de péptidos modificadas por MDA en apo B-100 producen una reactividad cruzada contra secuencias nativas. La incapacidad de LDL nativa para competir por la unión de anticuerpo a secuencias de péptidos de apo B-100 nativas es sorprendente, pero puede indicar que estas secuencias sólo se exponen después de la degradación proteolítica de apo B-100 que se produce como resultado de la oxidación de LDL. Tanto las partes hidrófilas como hidrófobas de la molécula fueron reconocidas por anticuerpos. Se realizó un segundo cribado de la biblioteca de péptidos de apo B-100 usando plasma reunido de sujetos con signos clínicos de enfermedad cardiaca coronaria ECC, infarto de miocardio agudo (IMA) y angina inestable (n=10). Los anticuerpos en plasma de ECC reunido se unieron a las mismas secuencias y con la misma distribución global que para anticuerpos en plasma de control sano. Sin embargo, los títulos de anticuerpos para varios péptidos (nº 1, 30-34, 100, 107, 148, 149, 162, 169, 236, 252 y 301) fueron al menos dos veces más elevados que en el plasma de control en comparación con el plasma de sujetos con ECC, mientras que los títulos contra algunos péptidos (nº 10, 45, 111, 154, 199, 222 y 240) fueron mayores en el plasma de pacientes con ECC en comparación con controles. Entonces, los inventores realizaron un estudio clínico prospectivo para investigar si los niveles de anticuerpos contra secuencias de péptidos modificadas por MDA en apo B-100 predecían el riesgo de desarrollar ECC. Usando un diseño de control de casos anidados los inventores seleccionaron 78 sujetos con acontecimientos coronarios (IMA o muerte debida a ECC) y 149 controles del Estudio de dieta y cáncer de Malmö. Ningún caso ni individuo de control tuvo una historia de IM previo o accidente cerebrovascular. La mediana del tiempo desde la inclusión hasta el acontecimiento coronario agudo fue 2,8 años (intervalo 0,1-5,9 años) entre casos. Los niveles de anticuerpos se determinaron en muestras de plasma de referencia complementadas con antioxidantes. Usando el espesor de la íntima/media de la carótida (EIM) como se evaluó por ultrasonografía en el nivel inicial los inventores también analizaron asociaciones entre niveles de anticuerpos y grado de enfermedad vascular existente. Los inventores estudiaron 8 secuencias de péptidos modificadas por MDA que en los estudios de cribado inicial se asociaron a altos niveles de anticuerpos en plasma (nº 74, 102 y 210) y/o diferencias marcadas entre conjuntos de plasma de control y con ECC (nº 32, 45, 129, 162 y 240). Se encontró que los controles tenían mayores niveles de IgM contra MDA-péptido 74 (0,258, intervalo 0-1,123 unidades de absorbancia frente a 0,178, intervalo 0-0,732 unidades de absorbancia, $p < 0,05$), por lo demás no hubo diferencias en niveles de anticuerpos entre casos y controles. Las asociaciones entre EIM e IgM contra MDA-péptidos nº 102, 129 y 162 ($r = 0,233, 0,232, y 0,234$, respectivamente, $p < 0,05$) se observaron en casos y entre EIM y MDA-péptido 45 MDA ($r = 0,18, p < 0,05$) en controles. Se observaron correlaciones débiles entre anticuerpos para MDA-péptido 129 con MDA y colesterol total y LDL ($r = 0,19 y r = 0,19, p < 0,01$, respectivamente), por lo demás los niveles de anticuerpos de péptidos no mostraron asociaciones con colesterol total en plasma, colesterol LDL, colesterol HDL o triglicéridos en plasma. Hubo fuertes covariaciones entre niveles de anticuerpos para los diferentes péptidos (valores de r que oscilan de 0,6 a 0,9). La única excepción fue anticuerpos contra el MDA-péptido 74 que estuvieron débilmente relacionados o no estuvieron relacionados en absoluto con anticuerpos contra los otros péptidos.

Los anticuerpos contra todas las secuencias, excepto MPD-péptido 74, se asociaron inversamente a la edad entre casos (valores r que oscilan de -0,38 a -0,58, $p < 0,010,001$), pero no en controles. A diferencia, los niveles en plasma de LDL oxidada aumentaron con la edad. De nuevo, esta asociación fue más fuerte en los casos que en los controles. Para investigar si las asociaciones entre respuestas inmunitarias contra secuencias de péptidos modificadas por MDA y enfermedad cardiovascular fueron diferentes en diferentes grupos de edad se realizó un análisis de subgrupos en casos y controles por debajo y por encima de la mediana de la edad (61 años). En los

casos del grupo de edad más joven habían aumentado los niveles de anticuerpos contra los péptidos 32 y 45 y disminuido los niveles de anticuerpos contra el péptido 74 con respecto a controles, mientras que no se observaron diferencias en el grupo de edad mayor. Los anticuerpos contra todas las secuencias de MDA-péptidos, excepto el péptido 74, se asociaron significativamente a EIM en el grupo de edad más joven, pero no en el edad mayor (tabla).

5 Estos estudios identifican varias secuencias modificadas por MDA en apo B-100 que son reconocidas por anticuerpos humanos. La modificación por MDA de apo B-100 se produce como resultado de la oxidación de LDL que indica que estos anticuerpos pertenecen a la familia de los autoanticuerpos de LDL oxidada previamente descritos. Esta noción también puede soportarse por la observación de que la unión de anticuerpos a péptidos de apo B-100 modificados por MDA es competida por la adición de LDL oxidada. Junto con los fosfolípidos oxidados
10 identificados por Hörkkö y col., es probable que estas secuencias de péptidos modificadas por MDA constituyan la gran mayoría de las estructuras antigénicas en LDL oxidada. En similitud con los anticuerpos de antifosfolípido de LDL oxidada, los anticuerpos contra secuencias de apo B-100 modificadas por MDA fueron de tipo IgM. Esto puede sugerir que los últimos anticuerpos también pertenecen a la familia de anticuerpos naturales T 15. A los anticuerpos T 15 se les ha atribuido una función importante en la defensa temprana independiente de linfocitos T contra
15 infecciones bacterianas, además de en la eliminación de células apoptóticas. Queda por determinar si los anticuerpos de MDA-péptido descritos aquí tienen funciones similares. Los anticuerpos también se identificaron contra un gran número de secuencias de apo B-100 nativas. Sin embargo, la sorprendente covariación entre anticuerpos con respecto a secuencias nativas y modificadas por MDA sugiere que estos anticuerpos también se forman en respuesta a la oxidación de LDL. También es posible que los anticuerpos contra una secuencia de péptidos modificada por MDA reaccione de forma cruzada con la secuencia nativa correspondiente. Si los anticuerpos contra secuencias de apo B-100 nativas también se unen a partículas de LDL nativa, es probable que
20 tengan una mayor influencia sobre el metabolismo de LDL. Sin embargo, el hallazgo de que la LDL nativa no compite por la unión de anticuerpos a secuencias de apo B-100 nativas, además de la falta de correlación entre anticuerpos contra secuencias de apo B-100 nativas y niveles de colesterol LDL, argumenta contra la existencia de un fenómeno tal.
25

Los anticuerpos contra secuencias de péptidos modificadas por MDA disminuyeron progresivamente con la edad en los casos, pero no en los controles. Con la excepción de MDA-péptido 74, los anticuerpos IgM contra MDA-péptidos se asociaron significativamente al EIM de la carótida en el grupo de edad más joven (inferior 62 años), pero no en el
30 grupo de edad mayor. Estos hallazgos sugieren que cambios significativos en las interacciones entre el sistema inmunitario y la pared vascular aterosclerótica tienen lugar entre las edades de 50 y 70 años. Una posibilidad es que en individuos más jóvenes el proceso de enfermedad aterosclerótica esté en una etapa más activa con una implicación más prominente de células inmunitarias. Otra posibilidad es que la disminución de los niveles de anticuerpos contra secuencias de péptidos modificadas por MDA en sujetos mayores refleje una senescencia de las
35 células inmunitarias implicadas en la aterosclerosis. Se ha propuesto que una función alterada de células inmunitarias debido a inmunosenescencia contribuye a un aumento de la susceptibilidad para infección y cáncer en la población más anciana. Interesantemente, la inmunosenescencia es inhibida por antioxidantes que indican la implicación de estrés oxidativo. Es probable que las células inmunitarias que interactúan con epítopes en LDL oxidada se expongan particularmente a estrés oxidativo. Como la LDL oxidada ya está presente en arterias en una edad muy temprana, estas respuestas inmunitarias están siendo continuamente inducidas durante varias décadas, que pueden contribuir adicionalmente a un desarrollo de inmunosenescencia.
40

Se encontró que el aumento de anticuerpos contra dos sitios en apo B-100 predecía el riesgo de infarto de miocardio y muerte coronaria en sujetos de menos de 62 años de edad. Los anticuerpos contra estos sitios mostraron un alto
45 nivel de covariación sugiriendo que se produjeron en respuesta a los mismos procesos patofisiológicos subyacentes. El hecho de que la mediana del tiempo de muestreo de sangre para el acontecimiento coronario fuera sólo 2,8 años hace que estos anticuerpos sean particularmente interesantes como marcadores para el aumento del riesgo de ECC. Los niveles de anticuerpos contra secuencias de péptidos de apo B-100 modificadas por MDA no mostraron asociaciones con otros factores de riesgo de ECC tales como hiperlipidemia, hipertensión y diabetes, sugiriendo que son marcadores independientes del riesgo de ECC. Los casos de ECC en el presente estudio no fueron individuos de riesgo extremadamente alto y a este respecto son representativos del paciente con ECC común. El hallazgo de que la IgM contra secuencias de apo B-100 modificadas por MDA predice el riesgo a corto plazo del desarrollo de acontecimientos coronarios agudos en individuos que no se habrían identificado como de alto riesgo cribando
50 factores de riesgo establecidos sugiere que puede convertirse en un instrumento útil en la identificación de individuos en necesidad de tratamiento preventivo agresivo. Sin embargo, se requieren estudios prospectivos considerablemente mayores con análisis multifactorial antes de que pueda establecerse completamente el valor clínico de la determinación de anticuerpos contra secuencias de péptidos de apo B-100 modificadas por MDA. Otra limitación del presente estudio clínico es que los inventores sólo han analizado anticuerpos contra un número pequeño de sitios antigénicos en apo B-100 y que los títulos de anticuerpos contra otros sitios pueden ser marcadores incluso mejores de riesgo cardiovascular.
60

En sujetos con una edad inferior a 60, los anticuerpos contra un gran número de sitios modificados por MDA en apo B-100 guardaron relación con el grado de enfermedad vascular existente como se ha evaluado por el EIM de la carótida. Los anticuerpos IgM estuvieron más estrechamente asociados al EIM de la carótida que los anticuerpos
65 IgG. Aunque el EIM de la carótida tiene limitaciones obvias como una medida de carga aterosclerótica general, estas observaciones todavía sugieren que la determinación de IgM contra secuencias modificadas por MDA en apo B-100

puede ser un procedimiento para evaluar la gravedad de aterosclerosis existente. Estas observaciones también están en línea con varios estudios previos que han informado de asociaciones entre enfermedad por arteria coronaria y carótida y anticuerpos IgM contra LDL oxidada.

- 5 Los anticuerpos contra el péptido 74 se diferenciaron en comparación con otros anticuerpos de péptido de apo B-100 en muchos aspectos. Fueron superiores en controles que en casos, no disminuyeron con la edad y no se asociaron al grado de enfermedad de la carótida. Por consiguiente, los anticuerpos contra esta secuencia de péptidos representan candidatos interesantes para una respuesta inmunitaria atero-protectora.
- 10 Una cuestión importante es por qué se producen estas asociaciones. Demuestran claramente que las respuestas inmunitarias contra sitios de apo B-100 modificados por MDA participan de alguna forma en el proceso de enfermedad aterosclerótica. Como altos niveles de anticuerpos están asociados a aterosclerosis más grave y aumento del riesgo de desarrollo de acontecimientos coronarios agudos, una posibilidad obvia es que estas respuestas inmunitarias promuevan la aterogénesis. Los estudios que demuestran que las respuestas inmunitarias
- 15 contra proteínas de choque térmico tales como HSP 65 son aterogénicas proporcionan algún apoyo para esta noción. Sin embargo, estudios en animales experimentales han mostrado un efecto atero-protector de la inmunización con LDL oxidada. La reconstitución de linfocitos B de ratones nulos en apo E ectomizados en el bazo produce una disminución en la aterosclerosis. La reducción de la aterosclerosis también se ha observado en ratones nulos en apo E a los que se les administraron inyecciones repetidas de inmunoglobulina. Las presentes
- 20 observaciones no argumentan necesariamente contra una función atero-protectora de respuestas inmunitarias contra LDL oxidada. Estas respuestas inmunitarias se activan por procesos pro-aterogénicos tales como oxidación de LDL. Por consiguiente, también es probable que estén en proporción con la gravedad del proceso de enfermedad y podrían servir de marcadores de gravedad de la enfermedad y riesgo de ECC sin contribuir a la progresión de la enfermedad. El hallazgo de que la inmunización de ratones nulos en apo E con secuencias de péptidos de apo B-
- 25 100 inhibe el desarrollo de aterosclerosis informado en dos artículos adjuntos demuestra que es probable que este sea el caso. De hecho, el resultado más importante del presente estudio puede ser bien la identificación de estructuras que podrían usarse como componentes de una vacuna contra la aterosclerosis. La observación de que la disminución en anticuerpos contra secuencias de péptidos modificadas por MDA en apo B-100 que se produce con la edad va acompañada de un aumento en niveles en plasma de LDL oxidada sugiere que un aumento de la
- 30 eliminación de LDL mínimamente oxidada de la circulación puede ser un mecanismo por el que estos anticuerpos podrían proteger contra la aterosclerosis.

Procedimientos

35 Población del estudio

Los sujetos del estudio, nacidos entre 1926-45, pertenecen a la cohorte del estudio "Dieta y cáncer (MDC)" de Malmö. Un 50% al azar de aquellos que entraron en el estudio MDC entre noviembre de 1991 y febrero de 1994 fueron invitados a tomar parte en un estudio sobre la epidemiología de la enfermedad de la arteria carótida. Se ha

40 informado de las rutinas para el establecimiento de información sobre morbilidad y mortalidad tras el examen de salud, además de la definición de factores de riesgo tradicionales.

- Se identificaron ochenta y cinco casos de acontecimientos cardíacos coronarios agudos, es decir, IM mortal o no mortal, o muertes debidas a enfermedad cardíaca coronaria (ECC). Los participantes que tenían una historia de
- 45 infarto de miocardio o accidente cerebrovascular (n=6) no pudieron elegirse para el presente estudio. Para cada caso, dos controles sin una historia de infarto de miocardio o accidente cerebrovascular se correspondieron individualmente con la misma edad, sexo, tabaquismo, presencia de hipertensión y mes de participación en el examen de cribado y duración del seguimiento. Debido a un motivo logístico (las muestras de sangre no estuvieron disponibles en suficiente cantidad para la evaluación de péptidos), sólo un control estuvo disponible para siete casos
- 50 y sin controles para un caso. Este caso se excluyó del análisis. Por tanto, la población en estudio consiste en 227 sujetos, 78 casos y 149 controles, de edades 49-67 (mediana de 61) años en el nivel inicial.

Análisis de laboratorio

- 55 Después de ayunar durante la noche se extrajeron muestras de sangre para la determinación de valores en suero de colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL y glucosa en sangre completa. El colesterol LDL en mmol/l se calculó según la fórmula de Friedewald. La LDL oxidada se midió por ELISA (Mercordia).

Vasculografía ultrasónica en modo B

- 60 Un sistema de tomografía computerizada Acuson 128 (Acuson, Mountain View, California) con un transductor de MHz se usó para la evaluación de placas de la carótida en la arteria carótida derecha como se ha descrito previamente.

- 65 Desarrollo de ELISA contra secuencias de péptidos de apo B-100

Se sintetizaron los 302 péptidos correspondientes a la secuencia de aminoácidos de la apolipoproteína B humana entera (Euro-Diagnostica AB, Malmö, Suecia y KJ Ross Petersen AS, Horsholm, Dinamarca) y se usaron en ELISA. Una fracción de cada péptido sintético se modificó por MDA 0,5 M (Sigma-Aldrich Suecia AB, Estocolmo, Suecia) durante 3 h a 37°C y en presencia de liposomas por MDA 0,5 M durante 3 h a 37°C o por CuCl_2 5 mM (Sigma) durante 18 h a 37°C. Los péptidos modificados por MDA se dializaron contra PBS que contenía EDTA 1 mM con varios cambios durante 18 h a 4°C. La modificación de los péptidos se probó en geles de poliacrilamida desnaturalizados (BioRad Laboratories, Hercules, CA) adecuados para la separación de péptidos.

Una mezcla de fosfatidilcolina de huevo (EPC) (Sigma) y fosfatidilserina (PS) (Sigma) en una disolución de cloroformo a una relación molar de 9:1 y una concentración de fosfolípido 3 mM (PL) se evaporó en un recipiente de vidrio con corriente de argón suave. Entonces, el recipiente se colocó a vacío durante 3 horas. Una disolución que contenía péptido 0,10 mM (5 ml) en tampón HEPES 10 mM esterilizado por filtración a pH 7,4, NaCl 145 mM y 0,003% de azida de sodio se añadió a la película secada de EPC/PS y se incubó durante 15 min a 50°C. La mezcla se agitó con vórtex cuidadosamente durante aproximadamente 5 min a temperatura ambiente y luego se colocó en un baño de agua fría en hielo y se sonicó con 7,5 micrómetros de amplitud durante 3 x 3 min (Sonyprep 150 MSE Sanyo, Tamro-Medlab, Suecia) con interrupciones de 1 min. La mezcla de PL-péptido, nativa o modificada por MDA 0,5 M durante 3 h a 37°C o por CuCl_2 5 mM durante 18 h a 37°C, se almacenó bajo argón en viales de vidrio a 4°C envueltos en lámina de aluminio y se usaron en el transcurso de 1 semana. La mezcla modificada por MDA se dializó contra PBS que contenía EDTA 1 mM con varios cambios durante 18 h a 4°C antes del almacenamiento. La modificación de la mezcla se probó en geles de poliacrilamida desnaturalizados (BioRad Laboratories AB; Sundbyberg, SE) adecuados para la separación de péptidos.

Los péptidos sintéticos nativos o modificados diluidos en PBS a pH 7,4 (20 µg/ml), en presencia o ausencia de liposomas, se absorbieron a los pocillos de placas de microtitulación (Nunc MaxiSorp, Nunc, Roskilde, Dinamarca) en una incubación durante la noche a 4°C. Como referencia, uno de los péptidos (P6) se ejecutó sobre cada placa. Después de lavar con PBS que contenía 0,05% de Tween-20 (PBS-T), las placas recubiertas se bloquearon con SuperBlock en TBS (Pierce, Rockford, IL) durante 5 min a temperatura ambiente seguido de una incubación de plasma humano reunido, diluido 1/100 en TBS-0,05% de Tween-20 (TBS-T) durante 2 h a temperatura ambiente y luego durante la noche a 4°C. Después de aclararse, la deposición de autoanticuerpos dirigidos a los péptidos se detectó usando anticuerpos de conejo dirigidos contra IgG o IgM humana biotinilados (Dako A/S, Glostrup, Dinamarca) apropiadamente diluidos en TBS-T. Después de otra incubación durante 2 h a temperatura ambiente, las placas se lavaron y los anticuerpos biotinilados unidos se detectaron por estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma), se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. La reacción de color se desarrolló usando el kit de sustrato de fosfatasa (Pierce) y la absorbancia a 405 nm se midió después de 1 h de incubación a temperatura ambiente. Los valores de absorbancia de los diferentes péptidos se dividieron entre el valor de absorbancia de P6 y se compararon.

Estadística

Se usó SPSS para los análisis estadísticos. Los resultados se presentan como mediana e intervalo y como proporciones cuando sea apropiado. Se usaron diagramas de caja y diagramas de dispersión hasta que se ilustraron la relación entre la edad y los péptidos seleccionados entre casos y controles correspondientes. Las gráficas correspondientes también se usaron para ilustrar la relación entre la edad y los péptidos, casos y controles seleccionados, respectivamente, por debajo y por encima de la mediana de la edad (61 años) en el nivel inicial y por separado para casos y controles por debajo de la mediana de la edad. En casos y controles, por separado, los coeficientes de correlación parciales, ajustados para la edad y el sexo, se calcularon entre péptidos seleccionados y niveles de lípidos en sangre y EIM de la carótida común. Los coeficientes de correlación parciales ajustados a la edad y al sexo también se calcularon entre EIM de la carótida común y péptidos seleccionados en casos y controles por debajo y por encima de la mediana de la edad. Se usó una prueba de la t de muestras independientes para evaluar variables continuas normalmente distribuidas y una prueba de la χ^2 al cuadrado para proporciones entre casos y controles. Se usó la prueba no paramétrica (Mann-Whitney) para evaluar variables continuas no normalmente distribuidas entre casos y controles. Todos los valores de p son bilaterales.

Tabla

Coeficiente de correlación ajustado para la edad y el sexo para diferentes MDA-péptidos de referencia y espesor de la íntima-media de la arteria carótida común entre casos más jóvenes (49-61 años) y mayores (62-67 años) con infarto de miocardio y sus controles correspondientes correspondientes para la edad, sexo, tabaquismo e hipertensión.

PÉPTIDO	CASOS más CONTROLES	CASOS más CONTROLES
	Edades 49-61 años, n = 116	Edades 62-67 años, n =111
IGM		
MDA 32	0,235t	-0,101
MDA 45	0,366\$	-0,030
MDA 74	0,178	0,063
MDA 102	0,255\$	-0,039
MDA 129	0,330\$	-0,009
MDA 162	0,2451	0,001
MDA 210	0,254	0,013
MDA 240	0,284\$	0,006
IGG		
MDA 215	0,119	-0,059
p< 0,05; \$/x0,01		

REFERENCIAS

- 5 1. Ameli S y col. Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16, 1074-1079 (1996)
2. Freigang S, Hörrkö S, Miller E, Witztum J.L. & Palinski W. Immunization of LDL receptor-deficient mice with homologous malondialdehyde-modified and native LDL reduces progression of atherosclerosis by mechanisms other than induction of high titers of antibodies to oxidative neopeptides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18, 1972-1982 (1998)
3. George J y col. Hyperimmunization of apo-E-deficient mice with homologous malondialdehyde low-density lipoprotein suppresses early atherogenesis. *Atherosclerosis* 138, 147-152 (1998)
4. Alving C.R. y col. Immunization with cholesterol-rich liposomes induces anticholesterol antibodies and reduces diet-induced hypercholesterolemia and plaque formation. *J. Lab. Clin. Med.* 127,40-49 (1996)
5. Zhou X, Caligiuri G, Hamsten A, Lefvert A.K. & Hansson G.K. LDL immunization induces T-cell-dependent antibody formation and protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21, 108-114 (2001)
6. Nakashima Y, Plump A.S., Raines E.W., Breslow J.L. & Ross R. Apo-E-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14, 133-140 (1994)
7. Reddick R.L., Zhang S.H. & Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* 14, 141-147 (1994)
8. Shah P.K. y col. Effects of recombinant apolipoprotein A-I(Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 97, 780-785 (1998)
9. Glass, C.K. & Witztum, J.L. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* 104, 503-16. (2001).
10. Holvoet, P., Vanhaecke, J., Janssens, S., Van de Werf, F. & Collen, D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 98, 1487-94 (1998).
11. Ehara, S. y col. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 103, 1955-60. (2001).
12. Krych-Goldberg, M. & Atkinson, J.P. Structure-function relationships of complement receptor type 1. *Immunol Rev* 180, 112-22. (2001).
13. Nicoletti, A., Caligiuri, G., Paulsson, G. & Hansson, G.K. Functionality of specific immunity in atherosclerosis. *Am Heart J* 138, S438-43 (1999).
16. Chobanian, A.V., Haudenschild, C.C., Nickerson, C. & Drago, R. Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension* 15, 327-31. (1990).
17. Inoue, I. y col. Macrophage colony stimulating factor prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis* 93, 245-54. (1992).
18. Bourassa, P.A., Milos, P.M., Gaynor, B.J., Breslow, J.L. & Aiello, R.J. Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E- deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10022-7. (1996).

Val Ile Ser Ile Pro Arg Leu Gln Ala Glu Ala Arg Ser Glu Ile Leu
 1 5 10 15

Ala His Trp Ser
 20

<210> 4
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 4

Lys Leu Val Lys Glu Ala Leu Lys Glu Ser Gln Leu Pro Thr Val Met
 1 5 10 15

Asp Phe Arg Lys
 20

10 <210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 15 <400> 5

Leu Lys Phe Val Thr Gln Ala Glu Gly Ala Lys Gln Thr Glu Ala Thr
 1 5 10 15

Met Thr Phe Lys
 20

20 <210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 6

Asp Gly Ser Leu Arg His Lys Phe Leu Asp Ser Asn Ile Lys Phe Ser
 1 5 10 15

His Val Glu Lys
 20

25 <210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 30 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 7

Lys Gly Thr Tyr Glu Leu Ser Cys Gln Arg Asp Pro Asn Thr Gly Arg
 1 5 10 15

Leu Asn Gly Glu
 20

5 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 8

Arg Leu Asn Gly Glu Ser Asn Leu Arg Phe Asn Ser Ser Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Gly Thr Asn Gln
 20

10 <210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 15 <400> 9

Ser Leu Thr Ser Thr Ser Asp Leu Gln Ser Gly Ile Ile Lys Asn Thr
 1 5 10 15

Ala Ser Leu Lys
 20

20 <210> 10
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 10

Thr Ala Ser Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Glu Leu Thr Leu Lys Ser Asp
 1 5 10 15

Thr Asn Gly Lys
 20

25 <210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 30 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 11

Asp Met Thr Phe Ser Lys Gln Asn Ala Leu Leu Arg Ser Glu Tyr Gln
 1 5 10 15

Ala Asp Tyr Glu
 20

5 <210> 12
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 12

Met Lys Val Lys Ile Ile Arg Thr Ile Asp Gln Met Gln Asn Ser Glu
 1 5 10 15

Leu Gln Trp Pro
 20

10 <210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 15 <400> 13

Ile Ala Leu Asp Asp Ala Lys Ile Asn Phe Asn Glu Lys Leu Ser Gln
 1 5 10 15

Leu Gln Thr Tyr
 20

20 <210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 14

Lys Thr Thr Lys Gln Ser Phe Asp Leu Ser Val Lys Ala Gln Tyr Lys
 1 5 10 15

Lys Asn Lys His
 20

25 <210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 30 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 15

Glu Glu Glu Met Leu Glu Asn Val Ser Leu Val Cys Pro Lys Asp Ala
 1 5 10 15

Thr Arg Phe Lys
 20

5 <210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 16

Gly Ser Thr Ser His His Leu Val Ser Arg Lys Ser Ile Ser Ala Ala
 1 5 10 15

Leu Glu His Lys
 20

10 <210> 17
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 15 <400> 17

Ile Glu Asn Ile Asp Phe Asn Lys Ser Gly Ser Ser Thr Ala Ser Trp
 1 5 10 15

Ile Gln Asn Val
 20

20 <210> 18
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 18

Ile Arg Glu Val Thr Gln Arg Leu Asn Gly Glu Ile Gln Ala Leu Glu
 1 5 10 15

Leu Pro Gln Lys
 20

25 <210> 19
 <211> 20
 <212> PRT
 30 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 19

Glu Val Asp Val Leu Thr Lys Tyr Ser Gln Pro Glu Asp Ser Leu Ile
 1 5 10 15

Pro Phe Phe Glu
 20

5 <210> 20
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 20

His Thr Phe Leu Ile Tyr Ile Thr Glu Leu Leu Lys Lys Leu Gln Ser
 1 5 10 15

Thr Thr Val Met
 20

10 <210> 21
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 15 <400> 21

Leu Leu Asp Ile Ala Asn Tyr Leu Met Glu Gln Ile Gln Asp Asp Cys
 1 5 10 15

Thr Gly Asp Glu
 20

20 <210> 22
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 22

Cys Thr Gly Asp Glu Asp Tyr Thr Tyr Lys Ile Lys Arg Val Ile Gly
 1 5 10 15

Asn Met Gly Gln
 20

25 <210> 23
 <211> 20
 <212> PRT
 30 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 23

Gly Asn Met Gly Gln Thr Met Glu Gln Leu Thr Pro Glu Leu Lys Ser
 1 5 10 15

Ser Ile Leu Lys
 20

- <210> 24
- <211> 20
- 5 <212> PRT
- <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
- <400> 24

Ser Ser Ile Leu Lys Cys Val Gln Ser Thr Lys Pro Ser Leu Met Ile
 1 5 10 15

Gln Lys Ala Ala
 20

- 10 <210> 25
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
- 15 <400> 25

Ile Gln Lys Ala Ala Ile Gln Ala Leu Arg Lys Met Glu Pro Lys Asp
 1 5 10 15

Lys Asp Gln Glu
 20

- 20 <210> 26
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
- <400> 26

Trp Ile Gln Asn Val Asp Thr Lys Tyr Gln Ile Arg Ile Gln Ile Gln
 1 5 10 15

Glu Lys Leu Gln
 20

- 25
- <210> 27
- <211> 20
- <212> PRT
- 30 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
- <400> 27

Thr Tyr Ile Ser Asp Trp Trp Thr Leu Ala Ala Lys Asn Leu Thr Asp
 1 5 10 15

Phe Ala Glu Gln
 20

<210> 28
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 28

Glu Ala Thr Leu Gln Arg Ile Tyr Ser Leu Trp Glu His Ser Thr Lys
 1 5 10 15

Asn His Leu Gln
 20

10 <210> 29
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 15 <400> 29

Ala Leu Leu Val Pro Pro Glu Thr Glu Glu Ala Lys Gln Val Leu Phe
 1 5 10 15

Leu Asp Thr Val
 20

<210> 30
 20 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 30

Ile Glu Ile Gly Leu Glu Gly Lys Gly Phe Glu Pro Thr Leu Glu Ala
 1 5 10 15

Leu Phe Gly Lys
 20

25 <210> 31
 <211> 20
 <212> PRT
 30 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 31

Ser Gly Ala Ser Met Lys Leu Thr Thr Asn Gly Arg Phe Arg Glu His
 1 5 10 15

Asn Ala Lys Phe
 20

5 <210> 32
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 32

Asn Leu Ile Gly Asp Phe Glu Val Ala Glu Lys Ile Asn Ala Phe Arg
 1 5 10 15

Ala Lys Val His
 20

10 <210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 15 <400> 33

Gly His Ser Val Leu Thr Ala Lys Gly Met Ala Leu Phe Gly Glu Gly
 1 5 10 15

Lys Ala Glu Phe
 20

20 <210> 34
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 34

Phe Lys Ser Ser Val Ile Thr Leu Asn Thr Asn Ala Glu Leu Phe Asn
 1 5 10 15

Gln Ser Asp Ile
 20

25 <210> 35
 <211> 20
 <212> PRT
 30 <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
 <400> 35

Phe Pro Asp Leu Gly Gln Glu Val Ala Leu Asn Ala Asn Thr Lys Asn
 1 5 10 15

Gln Lys Ile Arg

20

- <210> 36
- <211> 20
- 5 <212> PRT
- <213> Lipoproteína de apo B-100 humana
- <400> 36

Ser Leu Asn Ser His Gly Leu Glu Leu Asn Ala Asp Ile Leu Gly Thr
 1 5 10 15

Asp Lys Ile Asn
 20

- 10 LISTA DE SECUENCIAS
- <110> Forskarpatent i Syd AB Cedars-Sinai Medical Center
- 15 <120> TERAPIA DE INMUNIZACIÓN BASADA EN PÉPTIDOS PARA EL TRATAMIENTO DE ATROSCLEROSIS
- <130> P16259EP02
- <140> EP08 151 489.5
- 20 <141> 15/02/2008
- <150> EP 02 714 667.9
- <151> 15/04/2002
- 25 <150> SE 0101232-7
- <151> 05/04/2001
- <150> SE 0103754-8
- <151> 09/11/2001
- 30 <150> PCT/SE02/00679
- <151> 05/04/2002
- <160> 36
- 35 <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- <211> 20
- 40 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
- 45 <400> 1

ES 2 367 146 T3

Phe Leu Asp Thr Val Tyr Gly Asn Cys Ser Thr His Phe Thr Val Lys
 1 5 10 15

Thr Arg Lys Gly
 20

<210> 2

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 2

10

Pro Gln Cys Ser Thr His Ile Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val His Ala
 1 5 10 15

Asn Pro Leu Leu
 20

<210> 3

<211> 20

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 3

20

Val Ile Ser Ile Pro Arg Leu Gln Ala Glu Ala Arg Ser Glu Ile Leu
 1 5 10 15

Ala His Trp Ser
 20

<210> 4

<211> 20

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 4

30

Lys Leu Val Lys Glu Ala Leu Lys Glu Ser Gln Leu Pro Thr Val Met
 1 5 10 15

Asp Phe Arg Lys
 20

<210> 5

<211> 20

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 5

Leu Lys Phe Val Thr Gln Ala Glu Gly Ala Lys Gln Thr Glu Ala Thr
 1 5 10 15

Met Thr Phe Lys
 20

- 5 <210> 6
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
- <400> 6

Asp Gly Ser Leu Arg His Lys Phe Leu Asp Ser Asn Ile Lys Phe Ser
 1 5 10 15

His Val Glu Lys
 20

- 15 <210> 7
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
- <400> 7

Lys Gly Thr Tyr Gly Leu Ser Cys Gln Arg Asp Pro Asn Thr Gly Arg
 1 5 10 15

Leu Asn Gly Glu
 20

- 25 <210> 8
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
- <400> 8

Arg Leu Asn Gly Glu Ser Asn Leu Arg Phe Asn Ser Ser Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Gly Thr Asn Gln
 20

- 35 <210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 9

Ser Leu Thr Ser Thr Ser Asp Leu Gln Ser Gly Ile Ile Lys Asn Thr
1 5 10 15

Ala Ser Leu Lys
20

10 <210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 10

Thr Ala Ser Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Glu Leu Thr Leu Lys Ser Asp
1 5 10 15

Thr Asn Gly Lys
20

20 <210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 11

Asp Met Thr Phe Ser Lys Gln Asn Ala Leu Leu Arg Ser Glu Tyr Gln
1 5 10 15

Ala Asp Tyr Glu
20

30 <210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 12

ES 2 367 146 T3

Met Lys Val Lys Ile Ile Arg Thr Ile Asp Gln Met Gln Asn Ser Glu
1 5 10 15

Leu Gln Trp Pro
20

<210> 13

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 13

10

Ile Ala Leu Asp Asp Ala Lys Ile Asn Phe Asn Glu Lys Leu Ser Gln
1 5 10 15

Leu Gln Thr Tyr
20

<210> 14

<211> 20

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 14

20

Lys Thr Thr Lys Gln Ser Phe Asp Leu Ser Val Lys Ala Gln Tyr Lys
1 5 10 15

Lys Asn Lys His
20

<210> 15

<211> 20

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 15

30

Glu Glu Glu Met Leu Glu Asn Val Ser Leu Val Cys Pro Lys Asp Ala
1 5 10 15

Thr Arg Phe Lys
20

<210> 16

<211> 20

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 16

Gly Ser Thr Ser His His Leu Val Ser Arg Lys Ser Ile Ser Ala Ala
 1 5 10 15

Leu Glu His Lys
 20

- 5 <210> 17
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
- <400> 17

Ile Glu Asn Ile Asp Phe Asn Lys Ser Gly Ser Ser Thr Ala Ser Trp
 1 5 10 15

Ile Gln Asn Val
 20

- 15 <210> 18
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
- <400> 18

Ile Arg Glu Val Thr Gln Arg Leu Asn Gly Glu Ile Gln Ala Leu Glu
 1 5 10 15

Leu Pro Gln Lys
 20

- 25 <210> 19
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
- <400> 19

Glu Val Asp Val Leu Thr Lys Tyr Ser Gln Pro Glu Asp Ser Leu Ile
 1 5 10 15

Pro Phe Phe Glu
 20

- 35 <210> 20
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 367 146 T3

<220>

<223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 20

His Thr Phe Leu Ile Tyr Ile Thr Glu Leu Leu Lys Lys Leu Gln Ser
1 5 10 15

Thr Thr Val Met
20

5

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 21

Leu Leu Asp Ile Ala Asn Tyr Leu Met Glu Gln Ile Gln Asp Asp Cys
1 5 10 15

Thr Gly Asp Glu
20

15

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 22

Cys Thr Gly Asp Glu Asp Tyr Thr Tyr Lys Ile Lys Arg Val Ile Gly
1 5 10 15

Asn Met Gly Gln
20

25

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 23

Gly Asn Met Gly Gln Thr Met Glu Gln Leu Thr Pro Glu Leu Lys Ser
1 5 10 15

Ser Ile Leu Lys
20

35

<210> 24

<211> 20

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
 <400> 24

5

Ser Ser Ile Leu Lys Cys Val Gln Ser Thr Lys Pro Ser Leu Met Ile
 1 5 10 15

Gln Lys Ala Ala
 20

<210> 25
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
 <400> 25

10

15

Ile Gln Lys Ala Ala Ile Gln Ala Leu Arg Lys Met Glu Pro Lys Asp
 1 5 10 15

Lys Asp Gln Glu
 20

<210> 26
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
 <400> 26

20

25

Ser Leu Asn Ser His Gly Leu Glu Leu Asn Ala Asp Ile Leu Gly Thr
 1 5 10 15

Asp Lys Ile Asn
 20

<210> 27
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
 <400> 27

30

35

Trp Ile Gln Asn Val Asp Thr Lys Tyr Gln Ile Arg Ile Gln Ile Gln
 1 5 10 15

Glu Lys Leu Gln
 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
 <400> 28

Thr Tyr Ile Ser Asp Trp Trp Thr Leu Ala Ala Lys Asn Leu Thr Asp
 1 5 10 15

10 Phe Ala Glu Gln
 20

<210> 29
 <211> 20
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
 <400> 29

Glu Ala Thr Leu Gln Arg Ile Tyr Ser Leu Trp Glu His Ser Thr Lys
 1 5 10 15

20 Asn His Leu Gln
 20

<210> 30
 <211> 20
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
 <400> 30

Ala Leu Leu Val Pro Pro Glu Thr Glu Glu Ala Lys Gln Val Leu Phe
 1 5 10 15

30 Leu Asp Thr Val
 20

<210> 31
 <211> 20
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
 <400> 31

ES 2 367 146 T3

Ile Glu Ile Gly Leu Glu Gly Lys Gly Phe Glu Pro Thr Leu Glu Ala
 1 5 10 15

Leu Phe Gly Lys
 20

5 <210> 32
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
 <400> 32
 10

Ser Gly Ala Ser Met Lys Leu Thr Thr Asn Gly Arg Phe Arg Glu His
 1 5 10 15

Asn Ala Lys Phe
 20

15 <210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
 <400> 33
 20

Asn Leu Ile Gly Asp Phe Glu Val Ala Glu Lys Ile Asn Ala Phe Arg
 1 5 10 15

Ala Lys Val His
 20

25 <210> 34
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
 <400> 34
 30

Gly His Ser Val Leu Thr Ala Lys Gly Met Ala Leu Phe Gly Glu Gly
 1 5 10 15

Lys Ala Glu Phe
 20

35 <210> 35
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana
 <400> 35

Phe Lys Ser Ser Val Ile Thr Leu Asn Thr Asn Ala Glu Leu Phe Asn
 1 5 10 15

Gln Ser Asp Ile
 20

5

<210> 36

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia parcial de la proteína de apo B-100 humana

<400> 36

Phe Pro Asp Leu Gly Gln Glu Val Ala Leu Asn Ala Asn Thr Lys Asn
 1 5 10 15

Gln Lys Ile Arg
 20

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. El péptido IEIGLEGKGFEPTEALFGK (SEC ID N°:31) o un epítoto contenido en este péptido, una forma oxidada de este péptido o un aldehído o malondialdehído derivado de este péptido.
2. El péptido, epítoto o derivado según la reivindicación 1 para su uso en inmunización o tratamiento terapéutico de mamíferos que incluyen seres humanos contra aterosclerosis o enfermedades cardiovasculares isquémicas.
- 10 3. El péptido, epítoto o derivado según la reivindicación 1 para su uso en el diagnóstico de la presencia o ausencia de anticuerpos relacionados con el aumento o la disminución de riesgo de desarrollar aterosclerosis y/o enfermedades cardiovasculares isquémicas.
4. Un péptido, epítoto o derivado para el uso según la reivindicación 2 ó 3 en una forma nativa.
- 15 5. Un péptido para el uso según la reivindicación 2 ó 3, en el que el péptido es un hapteno del derivado de aldehído.
6. Un péptido para su uso según la reivindicación 2 ó 3 en forma oxidada.
- 20 7. Un péptido para el uso según la reivindicación 6, en el que el péptido se ha oxidado usando cobre.
8. Un péptido para el uso según la reivindicación 2 ó 3, en el que el péptido se usa en una combinación con liposomas de fosfolípido.
- 25 9. Un péptido o derivado para el uso según la reivindicación 2 ó 3, en forma de un derivado de malondialdehído (MDA) del mismo o en forma de un derivado de hidroxinonal del mismo.
- 30 10. Uso del péptido o derivado según la reivindicación 1, en forma nativa o de un derivado de MDA o de hidroxinonal, o el epítoto, la preparación de una composición farmacéutica para inmunoterapia o terapia de aterosclerosis o enfermedades cardiovasculares isquémicas, opcionalmente en combinación con un adyuvante.
- 35 11. Uso según la reivindicación 10, en el que una dosis de inmunización es 1 a 100 mg del péptido.
12. Una preparación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido, epítoto o derivado según la reivindicación 1, opcionalmente en combinación con una o más cargas y/o adyuvantes farmacéuticamente inocuos.
- 40 13. Una preparación farmacéutica según la reivindicación 12, en la que el péptido está ligado a un vehículo, en el que el vehículo es albúmina de suero bovino cationizada y el adyuvante es hidróxido de aluminio.
- 45 14. Una preparación farmacéutica según la reivindicación 13, en la que la composición es una composición inyectable.
15. Una vacuna para su uso en la inmunización de mamíferos que incluye seres humanos contra aterosclerosis o enfermedades cardiovasculares isquémicas, vacuna que comprende el péptido, epítoto o derivado según la reivindicación 1, opcionalmente en combinación con un adyuvante.
16. Una vacuna según la reivindicación 15, en la que el péptido está ligado a un vehículo, en la que el vehículo es albúmina de suero bovino cationizada y el adyuvante es hidróxido de aluminio.

Péptidos 1-100 modificados por MDA, anticuerpos IgG

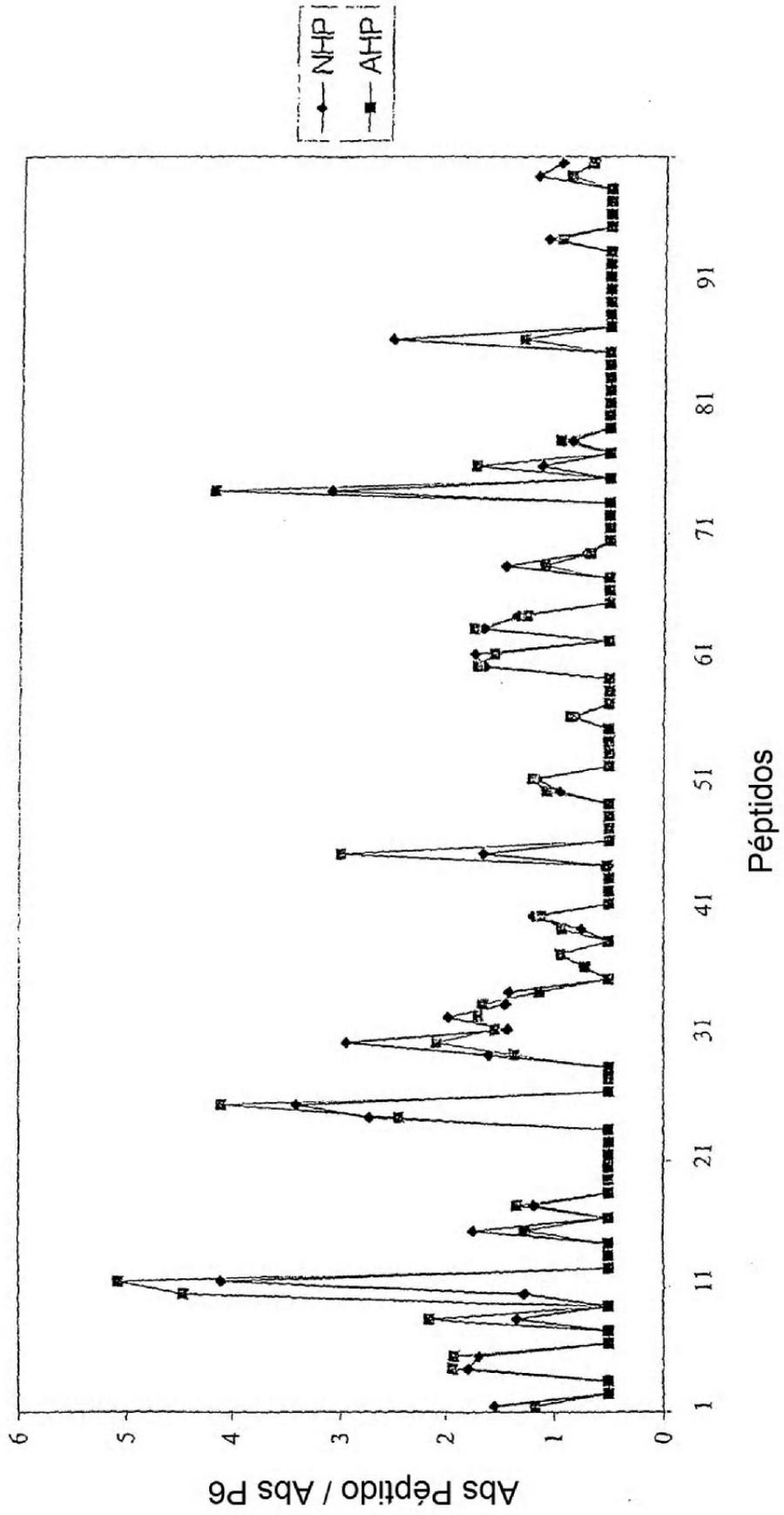


FIG. 1

Péptidos 101-200 modificados por MDA, anticuerpos IgG

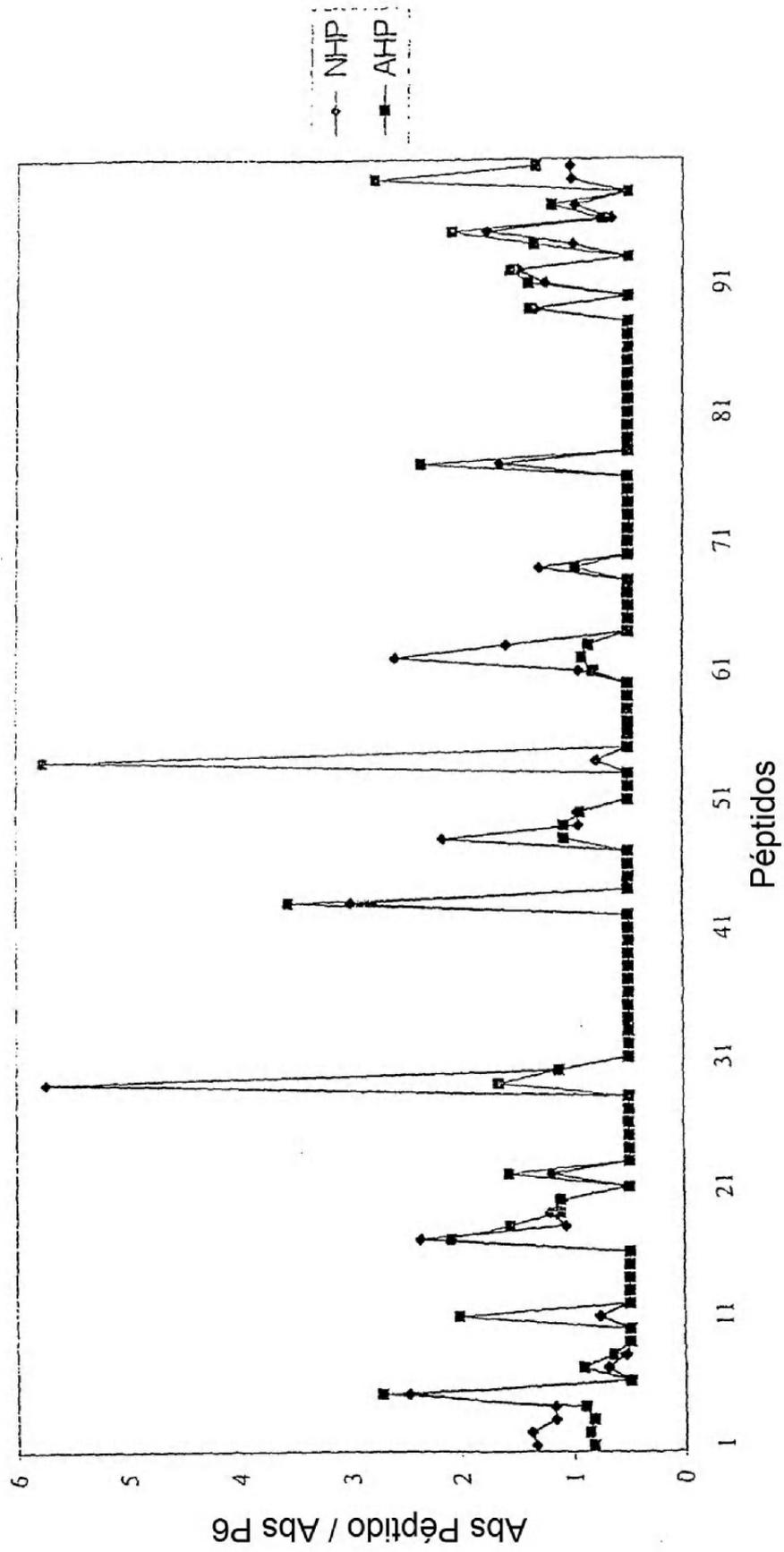


FIG. 2

Péptidos 201-302 modificados por MDA, anticuerpos IgG

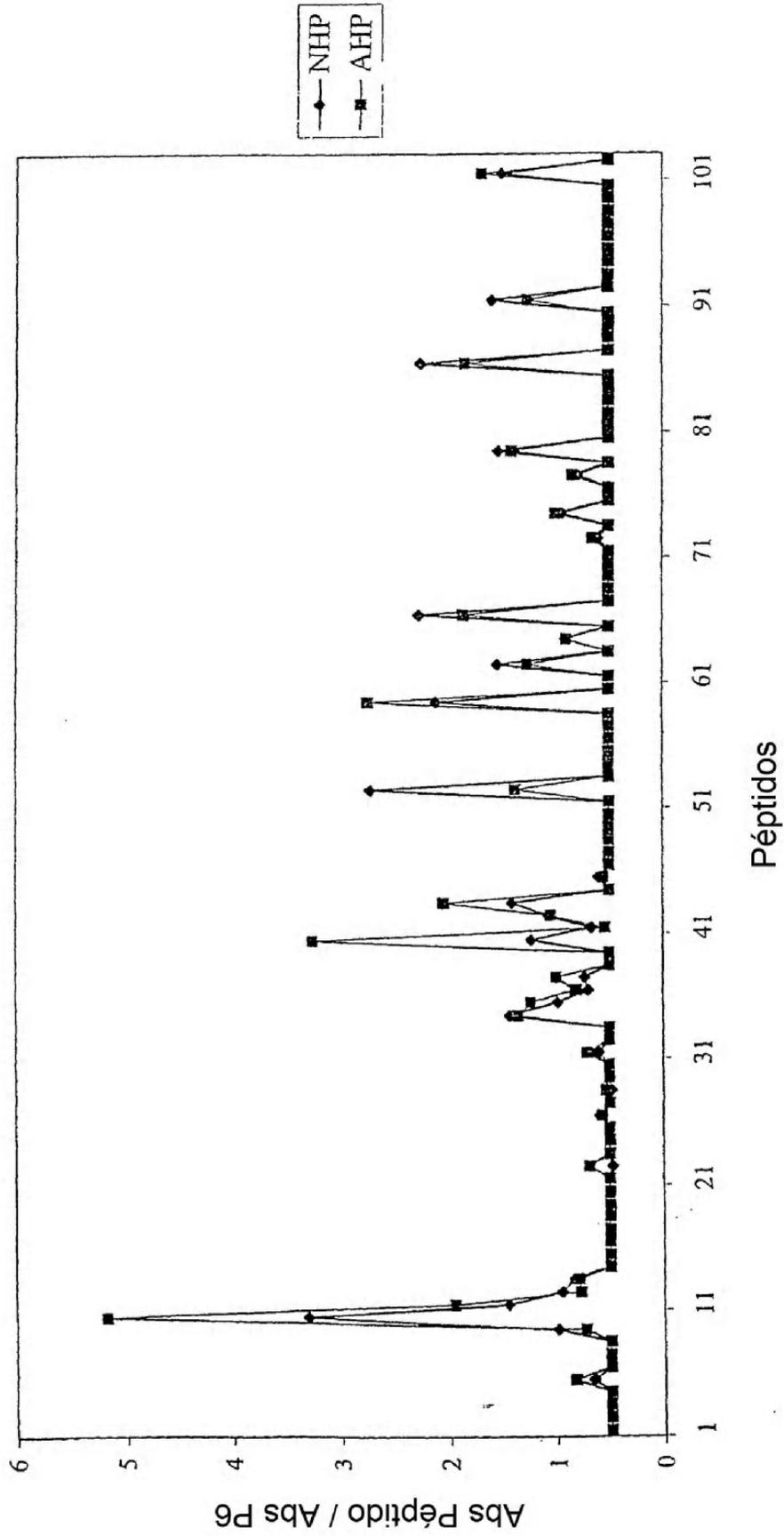


FIG. 3

Péptidos 1-100 modificados por MDA, anticuerpos IgM

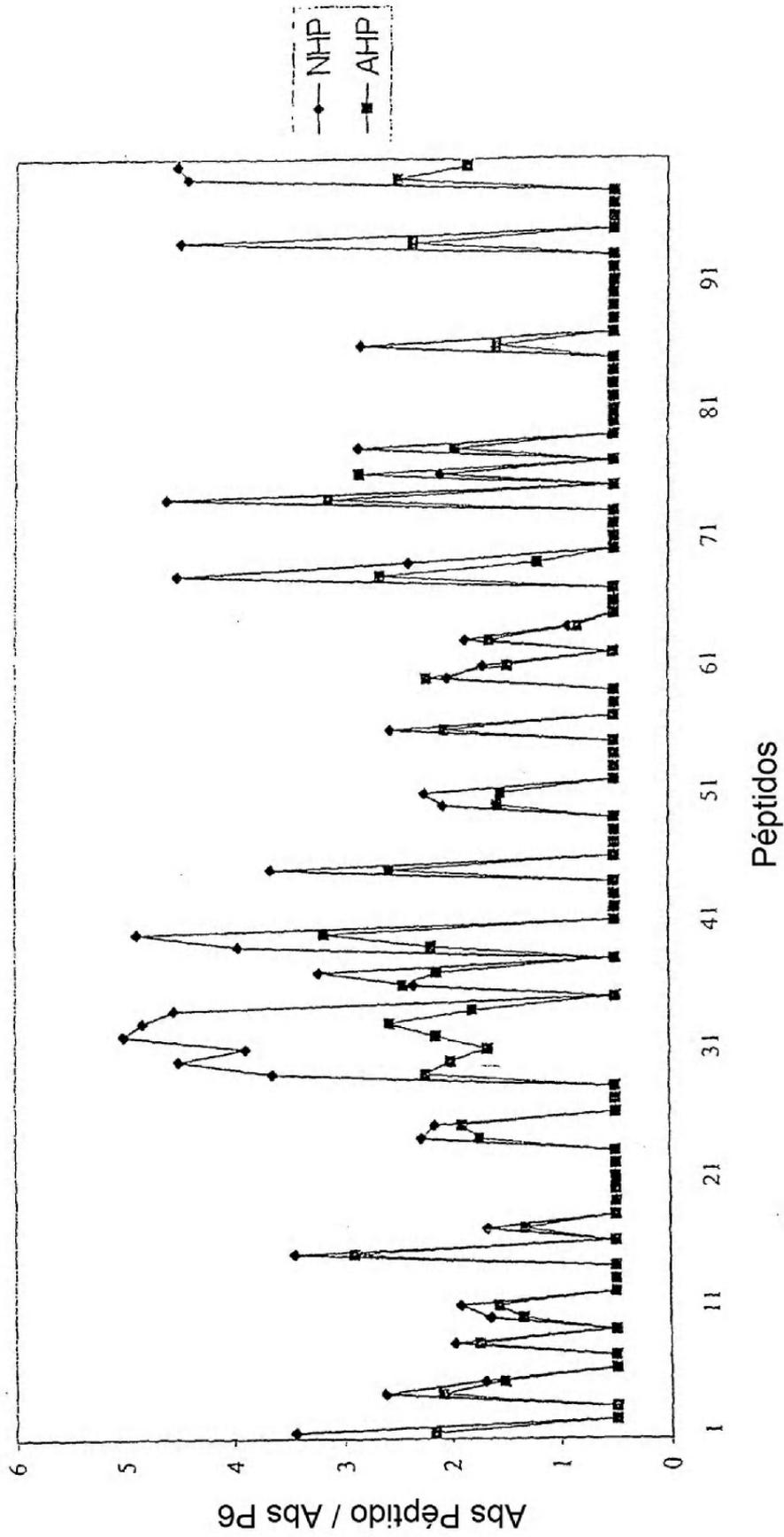


FIG. 4

Péptidos 101-200 modificados por MDA, anticuerpos IgM

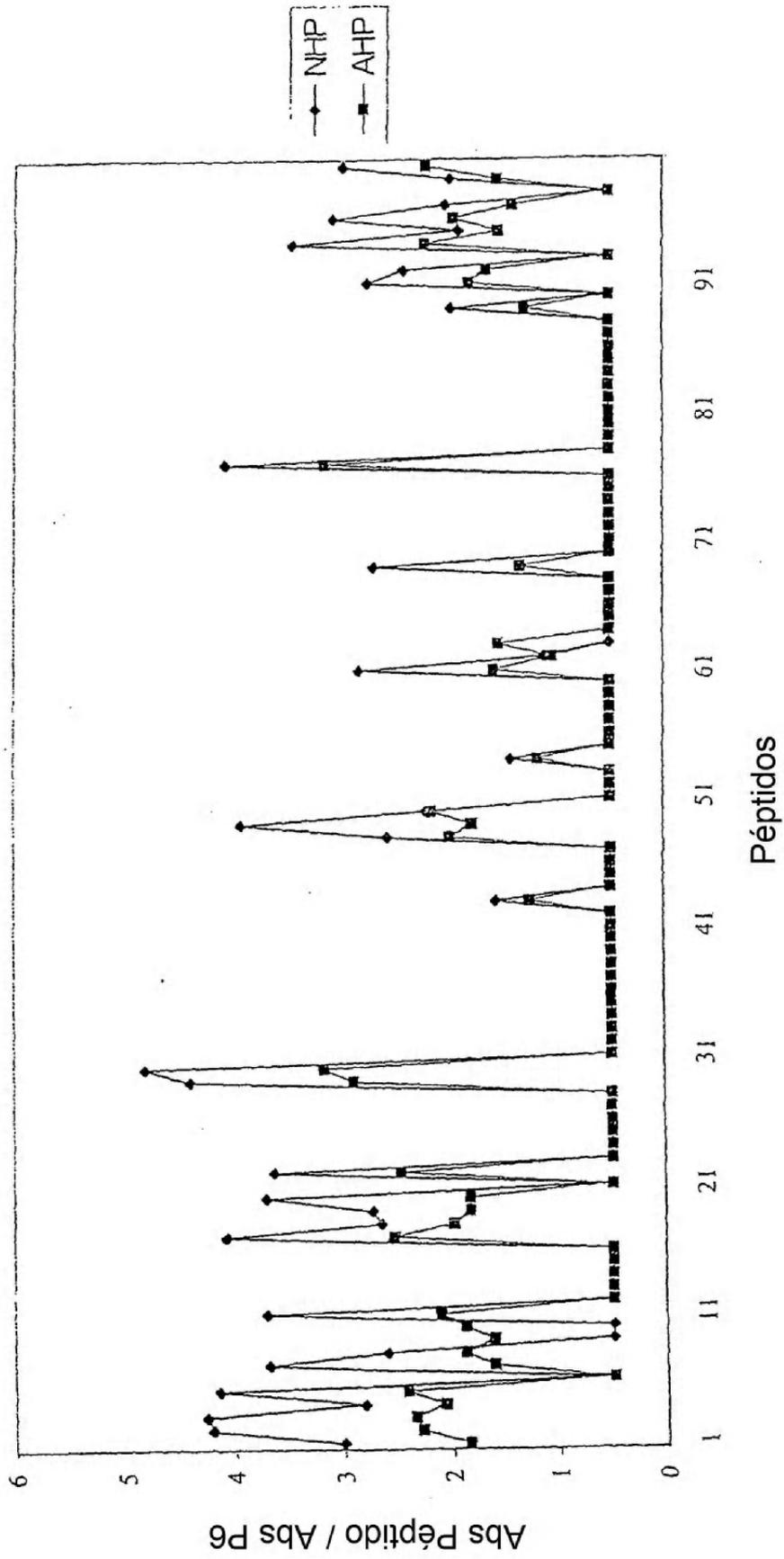


FIG. 5

Péptidos 201-302 modificados por MDA, anticuerpos IgM

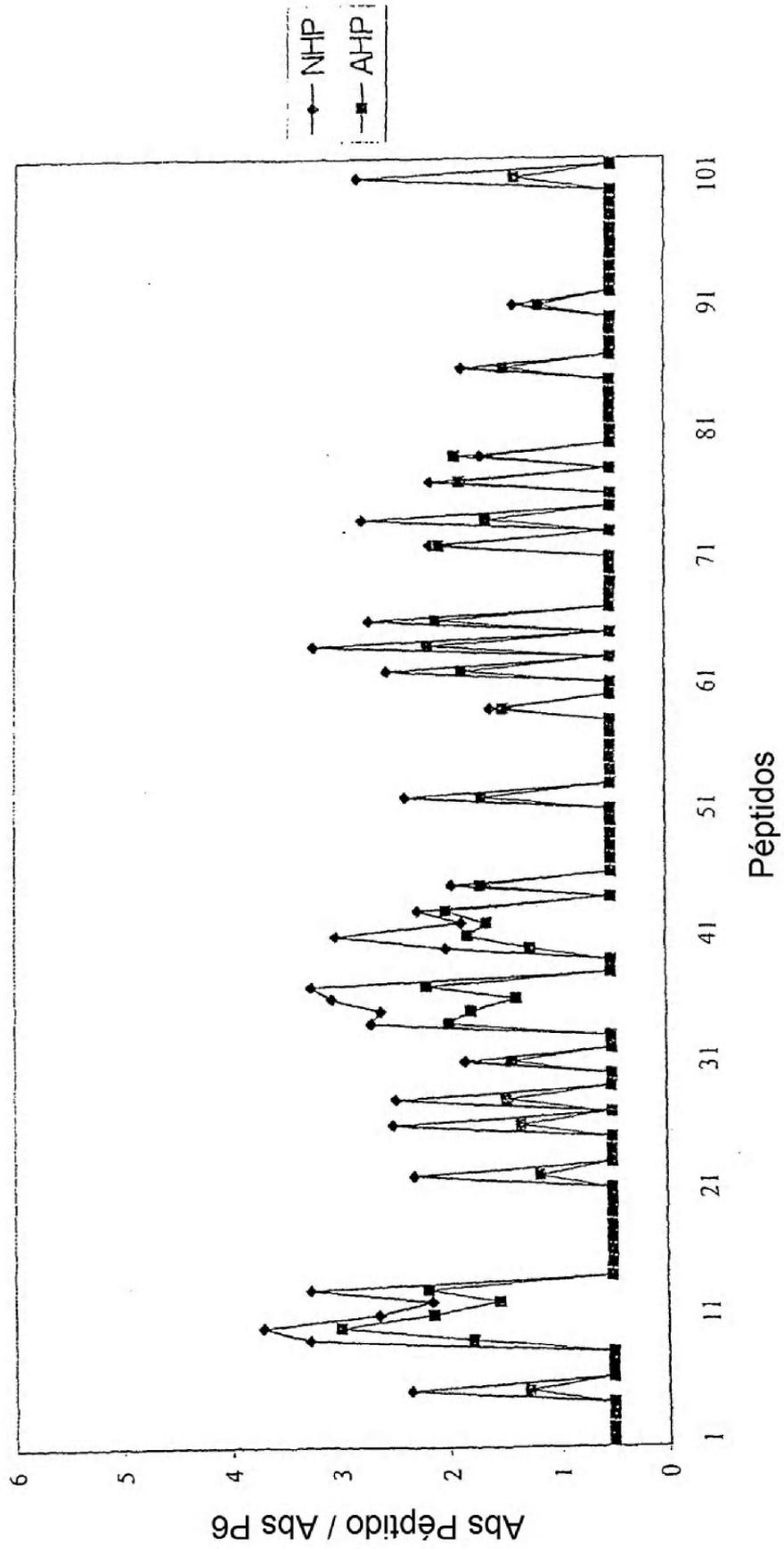


FIG. 6