

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 293**

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 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2002 E 10181267 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2295464**

54 Título: **Terapia de inmunización basada en péptidos para el tratamiento de aterosclerosis que fija ApoB como objetivo**

30 Prioridad:

05.04.2001 SE 0101232

09.11.2001 SE 0103754

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.09.2015

73 Titular/es:

CARDIOVAX, LLC (100.0%)
2390 Crenshaw Boulevard, Suite 202
Torrance, CA 90501, US

72 Inventor/es:

NILSSON, JAN y
SHAH, PREDIMAN K

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 546 293 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 que fija ApoB como objetivo

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un nuevo péptido, en particular un péptido a utilizar para la terapia de inmunización para el tratamiento de la aterosclerosis, y para el desarrollo de ELISA basado en péptidos para la determinación de la respuesta inmune frente a lipoproteínas de baja densidad oxidadas y al diagnóstico de la presencia o ausencia de aterosclerosis.

En particular la invención incluye:

- 10 1) El uso del péptido KTTKQSFDSLVSQAQYKKNKH (SEQ ID N°: 14) nativo o modificado con MDA, preferiblemente junto con un soporte y adyuvante adecuados como una inmunoterapia o vacuna "anti-aterosclerosis" para la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares isquémicas.
- 2) El uso del mismo péptido en ELISA para la detección de anticuerpos relacionados con el riesgo incrementado o disminuido del riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares isquémicas.

Antecedentes

15 La aterosclerosis es una enfermedad crónica que provoca un engrosamiento de la capa más interna (la íntima) de las arterias grandes y de tamaño medio. Disminuye el flujo sanguíneo y puede provocar isquemia y destrucción de los tejidos en los órganos suministrados por el vaso afectado. La aterosclerosis es la causa principal de las enfermedades cardiovasculares incluyendo infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y enfermedad arterial periférica. Es la principal causa de muerte en el mundo occidental y se predice que se convertirá en la principal causa de muerte en todo el mundo dentro de dos décadas.

La enfermedad se inicia por la acumulación de lipoproteínas, principalmente lipoproteínas de baja densidad (LDL), en la matriz extracelular del vaso. Estas partículas de LDL se agregan y sufren una modificación oxidativa. La LDL oxidada es tóxica y causa una lesión vascular. La aterosclerosis representa en muchos aspectos una respuesta a esta lesión incluyendo inflamación y fibrosis.

25 En 1989 Palinski y colaboradores identificaron auto-anticuerpos circulantes contra la LDL oxidada en los seres humanos. Esta observación sugirió que la aterosclerosis puede ser una enfermedad autoinmune provocada por reacciones inmunes contra lipoproteínas oxidadas. En este momento, varios laboratorios empezaron a buscar asociaciones entre los títulos de anticuerpos contra la LDL oxidada y la enfermedad cardiovascular. Sin embargo, la imagen que surge de estos estudios no era nada clara. Existían anticuerpos contra un gran número de diferentes epitopos en la LDL oxidada, pero la estructura de estos epitopos era desconocida. La expresión "anticuerpos contra LDL oxidada", por lo tanto, se refiere a una mezcla desconocida de diferentes anticuerpos en lugar de un anticuerpo específico. Anticuerpos IgM independientes de células T eran más frecuentes que los anticuerpos IgG dependientes de células T.

35 Los anticuerpos contra la LDL oxidada estaban presentes tanto en pacientes con enfermedad cardiovascular como en los controles sanos. Aunque algunos de los primeros estudios informaron sobre asociaciones entre los títulos de anticuerpos contra LDL oxidada y las enfermedades cardiovasculares, otros fueron incapaces de encontrar este tipo de asociaciones. Una debilidad principal de estos estudios era que los ensayos ELISA utilizados para determinar los títulos de anticuerpos utilizaban partículas de LDL oxidadas 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 se pueden determinar los niveles de anticuerpos contra los diferentes epitopos en las partículas de LDL oxidadas. Hasta cierto punto, debido a los problemas técnicos, ha sido difícil evaluar el papel de las respuestas de anticuerpos contra la LDL oxidada utilizando las técnicas disponibles hasta ahora, pero, sin embargo, no es posible crear componentes bien definidos y reproducibles de una vacuna si se deben utilizar partículas de LDL oxidadas intactas.

45 Otra forma de investigar la posibilidad de que las reacciones autoinmunes contra la LDL oxidada en la pared vascular desempeñan un papel clave en el desarrollo de la aterosclerosis es inmunizar animales contra su propia LDL oxidada. La idea detrás de este enfoque es que si las reacciones autoinmunes contra la LDL oxidada son reforzadas utilizando técnicas de inmunización clásicas, esto daría lugar a una mayor inflamación vascular y progresiva de la aterosclerosis. Para probar esta hipótesis se inmunizaron conejos con LDL oxidada homóloga y luego se les indujo aterosclerosis alimentando a los animales con una dieta alta en colesterol durante 3 meses.

50 Sin embargo, en contraposición con la hipótesis original de que la inmunización con LDL oxidada tenía un efecto protector reduciendo la aterosclerosis en aproximadamente un 50%. Resultados similares también se obtuvieron en un estudio posterior en el que la dieta alta en colesterol se combinó con una lesión del globo vascular para producir un desarrollo de la placa más agresivo. Paralelamente a los estudios realizados por los autores de la invención, varios otros laboratorios informaron de observaciones similares. Tomados en conjunto, los datos disponibles

demuestran claramente que existen reacciones inmunitarias que protegen contra el desarrollo de la aterosclerosis y que éstas implican autoinmunidad contra LDL oxidada.

Estas observaciones también sugieren la posibilidad de desarrollar una terapia inmune o "vacuna" para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular basada en la aterosclerosis en el hombre. Un enfoque para hacer esto sería inmunizar un individuo con su propia LDL después de haber sido oxidada por exposición a, por ejemplo, cobre. Sin embargo, este enfoque se complica por el hecho de que no se sabe qué estructura en la LDL oxidada es la responsable de inducir la inmunidad protectora y si la LDL oxidada también puede contener epítomos que pueden dar lugar a reacciones inmunes adversas.

La identificación de epítomos en la LDL oxidada es importante para varios aspectos:

En primer lugar, es probable que uno o varios de estos epítomos sean los responsables de activar la respuesta inmune anti-aterogénica observada en animales inmunizados con LDL oxidada. Por lo tanto, péptidos que contienen estos epítomos pueden representar una posibilidad para el desarrollo de una terapia inmune o "vacuna contra la aterosclerosis" en el hombre. Además, pueden utilizarse para el tratamiento terapéutico de la aterosclerosis desarrollada en el hombre.

En segundo lugar, los péptidos que contienen los epítomos identificados pueden utilizarse para desarrollar ELISAs capaces de detectar anticuerpos contra la estructura específica en las LDL oxidadas. Tales ensayos ELISAs serían más precisos y fiables que los actualmente disponibles utilizando partículas de LDL oxidadas como antígeno. También permitirían los análisis de respuestas inmunes frente a diferentes epítomos en las LDL oxidadas asociadas con la enfermedad cardiovascular.

La patente de EE.UU. 5.972.890 se refiere a un uso de péptidos para el diagnóstico de la aterosclerosis. La técnica presentada en dicha patente de EE.UU. es como un principio de una forma de diagnóstico radiofísico. Una secuencia peptídica se marca radiactivamente y se inyecta en el torrente sanguíneo. Si esta secuencia de péptidos debiera ser idéntica a las secuencias presentes en la apolipoproteína B, se unirá al tejido en donde existen receptores presentes para la apolipoproteína B. En los vasos esto es, sobre todo, la placa aterosclerótica. La concentración de radiactividad en la pared del vaso se puede determinar, p. ej., por medio de una cámara gamma. La técnica es, pues, un método de diagnóstico radiofísico basado en que las secuencias de péptidos marcados radiactivamente se unirán a sus receptores de tejido normales presentes en la placa aterosclerótica y se detectan utilizando un análisis de radiactividad externa. Es un método de análisis directo para identificar la placa aterosclerótica. Se requiere que al paciente se le administren compuestos radiactivos.

La técnica de la presente invención se basa en principios y métodos bastante diferentes. De acuerdo con la reivindicación 1, la invención se refiere al fragmento KTTKQSFDSLVSKAQYKKNKH (SEQ ID N°: 14) de la apolipoproteína B para la inmunización contra la enfermedad cardiovascular. Reacciones inmunológicas de este tipo han demostrado, a su vez, estar incrementadas en individuos que tienen una aterosclerosis desarrollada. La presente técnica se basa en la unión de secuencias de péptidos en el fondo de los pocillos de polímero. Cuando se añade una muestra de sangre los péptidos se unirán a anticuerpos, que son específicos para estas secuencias. La cantidad de anticuerpos unidos se determina entonces utilizando un método/técnica inmunológico. En contraposición con la técnica de dicha patente de EE.UU. esta técnica, por lo tanto, no es un método de determinación directa para identificar y localizar la placa aterosclerótica, sino que determina una respuesta inmunológica, lo que demuestra un alto grado de co-variación con la extensión de la aterosclerosis.

El principio básico de la presente invención es, por lo tanto, bastante diferente al de dicha patente. Este último depende de la unión de secuencias de péptidos a los receptores normales de las lipoproteínas presentes en el tejido aterosclerótico, mientras que el primero se basa en el descubrimiento de reacciones inmunes contra secuencias de péptidos y la determinación de anticuerpos para estas secuencias de péptidos.

Estudios publicados (Palinski et al., 1995, y George et al., 1998) han demostrado que la inmunización contra la LDL oxidada reduce el desarrollo de la aterosclerosis. Esto indicaría que las reacciones inmunes contra la LDL oxidada, en general, tienen un efecto protector. Los resultados dados en esta memoria han demostrado, sin embargo, sorprendentemente, que este no es siempre el caso. P. ej., la inmunización utilizando una mezcla de péptidos n°s 10, 45, 154, 199 y 240 dieron lugar a un incremento del desarrollo de la aterosclerosis. La inmunización utilizando otras secuencias peptídicas, p. ej., secuencias peptídicas n°s 1 y 30 a 34 carece de efecto total sobre el desarrollo de la aterosclerosis. Los resultados son sorprendentes, ya que proporcionan base para el hecho de que las reacciones inmunes contra la LDL oxidada pueden proteger frente al desarrollo, contribuir al desarrollo de la aterosclerosis, y estar sin efecto alguno en absoluto dependiendo de a qué estructuras en la LDL oxidada estén dirigidas. Estos hallazgos hacen posible el desarrollo de métodos de inmunización que aíslan la activación de la protección de reacciones inmunes. Además, demuestran que la inmunización utilizando LDL oxidada intacta podría tener un efecto perjudicial si las partículas utilizadas contienen un alto nivel de estructuras que dan lugar a reacciones inmunes 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. Esto es, pues,

totalmente diferente de la presente invención, en donde se describe un método para determinar anticuerpos contra LDL oxidada.

5 La patente de EE.UU. 4.970.144 se refiere a un método para preparar anticuerpos por medio de la inmunización utilizando secuencias peptídicas, anticuerpos que pueden ser utilizados para la determinación de apolipoproteínas utilizando ELISA. Esto es, por lo tanto, algo bastante diferente de la presente invención.

La patente de EE.UU. 5.861.276 describe un anticuerpo recombinante para la forma normal de apolipoproteína B. Este anticuerpo se utiliza para determinar la presencia de apolipoproteína B normal, en plasma y suero, y para tratar la aterosclerosis mediante la reducción de la cantidad de partículas de LDL normales en la circulación.

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

15 El documento EP 0 911 344 A1 describe un anticuerpo contra los 20 residuos C-terminales de ApoB48 para uso en el diagnóstico y el tratamiento de la hiperlipidemia y la esclerosis arterial.

20 El documento WO 98/42751 describe fragmentos oxidados con MDA de proteína de baja densidad basada en apolipoproteína B (es decir, ApoB100) que inhibe la absorción de LDL por parte de un receptor de LDL de alta afinidad. Estos fragmentos son útiles, p. ej., en el tratamiento y diagnóstico de la aterosclerosis. Además, estos fragmentos se pueden utilizar en inmunoterapia contra la aterosclerosis. Además, estos fragmentos se pueden utilizar en inmunoterapia contra la aterosclerosis. También se describen dirigidos contra los fragmentos. Los anticuerpos dirigidos en los péptidos modificados/LDL se pueden utilizar asimismo para la terapia y el diagnóstico de la aterosclerosis.

Compendio de la invención

25 Se cree que la oxidación de lipoproteínas, principalmente LDL, en la pared arterial es un factor importante en el desarrollo de la aterosclerosis. Los productos generados durante la oxidación de las LDL son tóxicos para las células vasculares, provocan inflamación e inician la formación de placa. Los epítomos en las LDL oxidadas son reconocidos por el sistema inmune y dan lugar a la formación de anticuerpos. Experimentos con animales han demostrado que algunas de estas respuestas inmunitarias tienen un efecto protector contra la aterosclerosis. Los anticuerpos están generalmente dirigidos, casi exclusivamente, contra estructuras basadas en péptidos. Utilizando un banco de polipéptidos que cubre la secuencia completa de la única proteína presente en LDL, la apolipoproteína B, los epítomos se han identificado en LDL oxidada que dan lugar a la formación de anticuerpos en el hombre. Estos epítomos peptídicos pueden utilizarse para desarrollar ELISAs para estudiar las asociaciones entre las respuestas inmunitarias contra la LDL oxidada y la enfermedad cardiovascular y para desarrollar una inmunoterapia o "vacuna" anti-aterosclerosis para la prevención y el tratamiento de la enfermedad cardiovascular isquémica.

35 Descripción detallada de la invención

40 Se ha realizado una caracterización molecular de los epítomos en la LDL oxidada que dan lugar a respuestas inmunitarias dependientes de anticuerpos en el hombre. El enfoque utilizado se aprovecha del hecho de que las reacciones inmunes se dirigen, casi exclusivamente, contra secuencias de péptidos de 5-6 aminoácidos de longitud. LDL sólo contiene una proteína, la apolipoproteína B de 4563 aminoácidos de longitud. Durante la oxidación, la apolipoproteína B es fragmentada y los aductos de aldehído son acoplados a los aminoácidos cargados positivamente, en particular lisina. Esto significa que las secuencias de péptidos, normalmente expuestas debido a la estructura tridimensional de la apolipoproteína B, se vuelven accesibles a las células inmunes y/o que las secuencias de péptidos, normalmente expuestas, se vuelven inmunogénicas debido a la haptización con aldehídos.

45 Con ello, se ha determinado que los siguientes péptidos, nativos o derivados de MDA, poseen una eficiencia tal como la producción de una respuesta inmunitaria, estos péptidos son

FLDTVYGNCSHTFTVKTRKG

PQCSTHILQWLKRVHANPLL

50 VISIPRLQAEARSEILAHWS

KLVKEALKESQLPTVMDFRK

LKFVTQAEQAKQTEATMTFK

DGSLRHKFLDSNIKFSHVEK
 KGTYGLSCQRDPNTGRLNGE
 RLNGESN LRFNSSYLQGTNQ
 SLTSTSDLQSGIIKNTASLK
 5 TASLKYENYELTLKSDTNGK
 DMTFSKQNALLRSEYQADYE
 MKVKIIRTIDQMQNSELQWP
 IALDDAKINFNEKLSQLQTY
 KTTKQSFDSL SVKAQYKKNKH
 10 EEEMLENVSLVCPKDATRFK
 GSTSHHLVSRKSISAALEHK
 IENIDFNKSGSSTASWIQNV
 IREVTQRLNGEIQALELPQK
 EVDVLTKYSQPEDSLIPFFE
 15 HTFLIYITELLKKLQSTTVM
 LLDIANYLMEQIQDDCTGDE
 CTGDEDYTYKIKRVIGNMGQ
 GNMGQTMEQLTPELKSSILK
 SSILKCVQSTKPSLMIQKAA
 20 IQKAAIQALRKMEPKDKDQE
 RLNGESN LRFNSSYLQGTNQ
 SLNSHGLELNADILGTDKIN
 WIQNVDTKYQIRIQIEKLQ
 TYISDWWTLAAKNLDFAEQ
 25 EATLQRIYSLWEHSTKNHLQ
 ALLVPPETEEAKQVFLDTV
 IEIGLEGKGFEPTEALFGK
 SGASMKLTFNGRFREHNAKF
 NLIGDFEVAEKINAFRAKVH
 30 GHSVLTAKGMALFGEGKAEF
 FKSSVITLNTNAELFNQSDI
 FPDLGQEVALNANTKNQKIR, así como el péptido no productor de anticuerpos
 ATRFKHLRKYTYNYEAESS

o un sitio activo de uno o más de estos péptidos.

35 **Material y Métodos**

Para determinar qué partes de la apolipoproteína B se vuelven inmunogénicas como resultado de la oxidación de LDL se produjo un banco de polipéptidos que consiste en péptidos de 20 aminoácidos de longitud que cubren la

secuencia humana completa de apolipoproteína B. Los péptidos se produjeron con un solapamiento de 5 aminoácidos para cubrir todas las secuencias en los puntos de rotura. Los péptidos se utilizaron en su estado nativo, o después de la incorporación en liposomas de fosfolípidos, después de la oxidación por exposición a cobre o después de modificación con malon-dialdehído (MDA) para imitar las diferentes modificaciones de los aminoácidos que pueden producirse durante la oxidación de LDL.

Péptidos

Se sintetizaron los 302 péptidos correspondientes a la secuencia completa de aminoácidos de la apolipoproteína B humana (Euro-Diagnostica AB, Malmö, Suecia y KJ Ross Petersen AS, Horsholm, Dinamarca) y se utilizaron en un ELISA. Una fracción de cada uno de los péptidos sintéticos se modificó con MDA 0,5 M (Sigma-Aldrich Sweden AB, Estocolmo, Suecia) durante 3 h a 37°C y en presencia de liposomas con MDA 0,5 M durante 3 h a 37°C o mediante CuCl₂ 5 µM (Sigma) durante 18 h a 37°C. Los péptidos modificados con 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 sometió a ensayo en geles de poli(acrilamida) desnaturizados (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), adecuados para la separación de péptidos. Los péptidos se numeraron 1-302 comenzando en el extremo N-terminal de la proteína.

Se pueden utilizar otros aldehídos para la preparación de derivados tales como hidroxinonenal y otros.

Liposomas

Una mezcla de fosfatidilcolina de huevo (EPC) (Sigma) y fosfatidilserina (PS) (Sigma) en una solución de cloroformo a una relación molar de 9:1 y una concentración de fosfolípidos (PL) 3 mM se evaporó en un recipiente de vidrio bajo una suave corriente de argón. El recipiente se colocó después bajo vacío durante 3 horas. Una disolución que contiene péptido 0,10 mM (5 ml) en tampón HEPES 10 mM pH 7,4, filtrado en condiciones estériles, NaCl 145 mM y azida de sodio al 0,003% se añadió a la película secada de EPC/PS y se incubó durante 15 min a 50°C. La mezcla fue suavemente sometida a un vórtice durante aproximadamente 5 min a temperatura ambiente y luego se colocó en un baño de agua enfriada con hielo y se trató con ultrasonidos con 7,5 micras 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 con MDA 0,5 M durante 3 h a 37°C o CuCl₂ 5 µM durante 18 h a 37°C, se almacenó bajo argón en viales de vidrio a 4°C envueltos en papel de aluminio y se utilizó en el espacio de 1 semana. La mezcla modificada con MDA fue dializada contra PBS que contenía EDTA 1 mM con varios cambios durante 18 h a 4°C antes de su almacenamiento. La modificación de la mezcla se sometió a ensayo en geles de poli(acrilamida) desnaturizada (Bio-Rad Laboratories AB, Sundbyberg, Suecia), adecuados para la separación de péptidos.

Muestras de plasma

Se recogieron y agruparon 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). Las dos agrupaciones se dividieron en partes alícuotas y se almacenaron a -80°C.

ELISA

Péptidos sintéticos nativos o modificados diluidos en PBS 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 en cada una de las placas. Después de lavar con PBS que contenía Tween-20 al 0,05% (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 agrupado, AHP o NHP, diluido 1/100 en TBS-Tween-20 al 0,05% (TBS-T) durante 2 h a temperatura ambiente y luego durante la noche a 4°C. Después de aclarar, la deposición de auto-anticuerpos dirigidos contra los péptidos se detectó mediante el uso de anticuerpos IgG o IgM anti-humanos de conejo 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 mediante estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. La reacción de color se desarrolló utilizando 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 fueron divididos por el valor de absorbancia de P6 y se compararon.

Las secuencias en la apolipoproteína B que fueron reconocidas por anticuerpos en el plasma humano se muestran como SEQ. ID 1-37 en el dibujo adjunto. Tanto AHP como NHP contenían anticuerpos contra un gran número de diferentes péptidos. Se identificaron anticuerpos contra péptidos tanto nativos como modificados. Generalmente, los títulos de anticuerpos contra péptidos modificados con MDA eran mayores o iguales a los del péptido nativo correspondiente. Comparación entre péptidos nativos, modificados con MDA, oxidados con cobre mostró un alto grado de correlación y que los títulos de anticuerpos más elevados se detectaron utilizando péptidos modificados con MDA. El uso de péptidos incorporados en liposomas no resultó en niveles incrementados de anticuerpos. Los anticuerpos de la subclase IgM eran más comunes que los anticuerpos del subtipo IgG.

ES 2 546 293 T3

Los péptidos contra los que se detectaron los niveles más elevados de anticuerpos podrían ser divididos en seis grupos con características comunes (Tabla 1):

- 5 (A) Altos niveles de anticuerpos IgG contra péptidos modificados con MDA (n = 3).
- (B) Altos niveles de anticuerpos IgM, pero sin diferencia entre los péptidos nativos y los modificados con MDA (n = 9).
- (C) Altos niveles de anticuerpos IgG, pero sin diferencia entre los péptidos nativos y los modificados con MDA (n = 2).
- (D) Altos niveles de anticuerpos IgG contra péptidos modificados con MDA y por lo menos el doble de anticuerpos en la agrupación de NHP, en comparación con la agrupación de AHP (n = 5).
- 10 (E) Altos niveles de anticuerpos IgM contra péptidos modificados con MDA y por lo menos el doble de anticuerpos en la agrupación de NHP, en comparación con la agrupación de AHP (n = 11).
- (F) Altos niveles de anticuerpos IgG, pero sin diferencia entre péptidos intactos y modificados con MDA, pero al menos el doble de anticuerpos en la agrupación de AHP, en comparación con la agrupación de NHP (n = 7).
- 15 (G) Ningún nivel de anticuerpos IgG o IgM.

Tabla 1

A. Alta IgG, diferencia MDA

P 11. FLDTVYGNCSHTFTVKTRKG

P 25. PQCSTHILQWLKRVHANPLL

20 P 74. VISIPRLQAEARSEILAHWS

B. Alta IgM, sin diferencia MDA

P 40. KLVKEALKESQLPTVMDFRK

P 68. LKFVTQAEGAKQTEATMTFK

P 94. DGSLRHKFLDSNIKFSHVEK

25 P 99. KGTYGLSCQRDPNTGRLNGE

P 100. RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ

P 102. SLTSTSDLQSGIINKNTASLK

P 103. TASLKYENYELTLKSDTNGK

P 105. DMTFSKQNALLRSEYQADYE

30 P 177. MKVKIIRTIDQMQNSELQWP

C. Alta IgG, sin diferencia MDA

P 143. IALDDAKINFNEKLSQLQTY

P 210. KTTKQSFDSL SVKAQYKKNKH

35 **D. NHS/AHP, ac IgG > 2, diferencia MDA**

P1. EEEMLENSLVCPKDATTRFK

P 129. GSTSHHLVSRKSISAALHKK

P 148. IENIDFNKSGSSTASWIQNV

P 162. IREVTQRLNGEIQALELPQK

P 252. EVDVLTKYSQPEDSLIPFFE

E. NHS/AHP, ac IgM > 2, diferencia MDA

P 301. HTFLIYITELLKKLQSTTVM

P 30. LLDIANYLMEQIQDDCTGDE

5

P 31. CTGDEDYTYKIKRVIGNMGQ

P 32. GNMGTMEQLTPELKSSILK

P 33. SSILKCVQSTKPSLMIQKAA

P 34. IQKAAIQALRKMEPKDKDQE

P 100. RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ

10

P 107. SLNSHGLELNADILGTDKIN

P 149. WIQNVDTKYQIRIQIQEKLQ

P 169. TYISDWWTLAAKNLTDFAEQ

P 236. EATLQRIYSLWEHSTKNHLQ

F. NHS/AHP, ac IgG < 0,5, sin diferencia MDA

15

P 10. ALLVPPETEEAKQVFLDVT

P 45. IEIGLEGKGFEPTEALFGK

P 111. SGASMKLTNNGRFREHNAKF

P 154. NLIGDFEVAEKINAFRAKVH

P 199. GHSVLTAKGMALFGEGKAEF

20

P 222. FKSSVITLNTNAELFNQSDI

P 240. FPDLGQEVALNANTKNQKIR

G.

P 2. ATRFKHLRKYTYNYEAESSS

25

Todas estas 38 secuencias de péptidos representan dianas para reacciones inmunitarias que pueden ser de importancia para el desarrollo de la aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares isquémicas. Estos péptidos pueden utilizarse, por lo tanto, para desarrollar ELISAs para determinar la asociación entre los niveles de anticuerpos contra secuencias definidas de aminoácidos modificados con MDA en la apolipoproteína B y el riesgo del desarrollo de la enfermedad cardiovascular.

30

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

35

Por lo tanto, en la proteína apolipoproteína B humana se han identificado 38 secuencias diferentes que dan lugar a respuestas inmunitarias significativas en el hombre. Estos epítomos son susceptibles de representar lo que previamente se ha descrito como anticuerpos contra LDL oxidada. Dado que la mayoría de las respuestas inmunitarias están dirigidas contra secuencias de péptidos y la apolipoproteína B es la única proteína en LDL, el enfoque utilizado en este proyecto debería ser capaz de identificar los epítomos específicos para esencialmente todos los anticuerpos contra partículas de LDL oxidada. Se ha descrito que una familia de anticuerpos específicos para fosfolípidos que incluyen anticuerpos contra cardiolipina reacciona con LDL oxidada, pero la especificidad y el papel de estos anticuerpos aún no se han caracterizado completamente.

40

En muchos casos, los títulos de anticuerpos eran mayores a polipéptidos modificados con MDA que para secuencias nativas. Si se detectaron anticuerpos contra una secuencia modificada con MDA esto se asociaba casi siempre con la presencia de anticuerpos contra la secuencia nativa. Una explicación probable de esto es que la respuesta

5 inmune contra una secuencia de aminoácidos modificada con MDA en la apolipoproteína B (la modificación con MDA se produce como resultado de la oxidación de LDL) conduce a una ruptura de la tolerancia contra la secuencia nativa. Para otras secuencias no existía diferencia en los títulos de anticuerpos contra secuencias modificadas con MDA o nativas. Esto sugeriría que las reacciones inmunes están dirigidas contra las secuencias nativas. No debería haber respuesta inmune contra secuencias de aminoácidos en proteínas normalmente expuestas al sistema inmune. En la partícula de LDL nativa grandes partes de la proteína apolipoproteína B están ocultas en la capa de fosfolípidos de LDL y, por lo tanto, no son accesibles para el sistema inmunológico. Durante la oxidación de LDL, la cadena de aminoácidos de apolipoproteína B está fragmentada, conduciendo a cambios en la estructura tridimensional. Esto es probable que conduzca a la exposición de secuencias de péptidos normalmente no accesibles para el sistema inmune y a la generación de anticuerpos contra estas secuencias que pueden explicar la presencia de anticuerpos contra las secuencias de apolipoproteína B nativas observadas. Alternativamente, la verdadera respuesta inmune es contra secuencias modificadas con MDA, pero la reactividad cruzada con secuencias nativas es tan grande que no se puede demostrar diferencia en la unión.

Tabla 2.

15 Asociaciones entre anticuerpos contra diferentes péptidos y aterosclerosis en la arteria carótida evaluada como grosor de íntima/media en 78 sujetos (26 sujetos que desarrollaron posteriormente infarto de miocardio, 26 controles sanos y 26 individuos de alto riesgo sin enfermedad).

Péptido	IgG		IgM	
	Nativa	modificada con MDA	Nativa	modificada con 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			++	■

20 +, $r > 0,2 < 0,3$, $p = < 0,05$; ++, $r > 0,3 < 0,4$, $p = 0,01$; +++, $r > 0,4$, $p = < 0,001$, gris, los niveles de anticuerpos contra péptidos aumentó significativamente en el grupo que sufre infarto de miocardio.

La posibilidad de que los ELISAs basados en estos péptidos (nativos o modificados con MDA) se puedan utilizar para determinar asociaciones entre la reacción inmune contra epítomos definidos en la LDL oxidada y la presencia y/o el riesgo de desarrollo de enfermedad cardio-vascular se investigó en un estudio piloto. El estudio se realizó en los sujetos participantes en el estudio de Malmö Diet Cancer, un estudio de base poblacional en el que se reclutaron más de 30.000 personas entre 1989 y 1993. Los niveles de anticuerpos contra los 24 de los 38 péptidos listados en la Tabla 1 se determinaron en muestras de plasma de línea de base de 26 sujetos que desarrollaron un infarto agudo de miocardio durante el período de seguimiento y 26 controles sanos emparejados por edad, sexo y tabaquismo. Un grupo adicional de 26 sujetos, emparejados por edad, sexo y tabaquismo, pero todos con niveles de colesterol LDL por encima de 5,0 mmol/L también se incluyó para estudiar los 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 los niveles de anticuerpos IgM contra péptidos modificados con MDA y la gravedad de la aterosclerosis en la arteria carótida (grosor íntima/media) según se evalúa mediante la investigación por ultrasonidos de la arteria carótida común, es decir, cuanto más altos sean los niveles de anticuerpos tanto más aterosclerosis se producirá (Tabla 2). Para muchos de estos péptidos también existían correlaciones significativas entre los niveles de anticuerpos contra péptidos nativos y el grosor de la íntima/media de la carótida. Sólo 4 péptidos mostraron una correlación significativa entre los anticuerpos IgG y el grosor de la íntima/media de la carótida. Estas observaciones sugieren que el ELISA que utiliza estos péptidos modificados con MDA (solos o en combinación) se puede utilizar para identificar sujetos con aterosclerosis incrementada.

Cuatro de los péptidos sometidos a ensayo no sólo se asociaron con una presencia incrementada de aterosclerosis, sino también estaban significativamente elevados en el grupo de sujetos que posteriormente sufrieron un infarto de miocardio (Tabla 2). Se muestran los datos para uno de estos péptidos (péptido 240) se muestran. Estas observaciones también demuestran que el ELISA basado en péptidos también puede utilizarse para identificar sujetos con un riesgo incrementado de desarrollar infarto de miocardio.

También hubo aumentos significativos en los niveles de anticuerpos IgG para los péptidos nativos 103, 162 y 199, así como 102 modificado con MDA en el grupo que más tarde sufrió un infarto de miocardio. Sin embargo, los anticuerpos IgG contra estos péptidos no se asociaron significativamente con la presencia de aterosclerosis en la arteria carótida.

Una observación particularmente interesante fue hecha con anticuerpos contra el péptido 210 modificado con MDA para los que no había niveles significativamente altos de anticuerpos IgM 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, anticuerpos contra el péptido 210 modificado con MDA puede representar un marcador para individuos con un riesgo disminuido de desarrollar enfermedad cardiovascular.

Ahora se ha demostrado que la inmunización con secuencias de péptidos apoB-100 nativas y modificadas con MDA resulta en una inhibición de la aterosclerosis en animales experimentales (Nordin Fredrikson, Söderberg et al, Chyu et al). Los mecanismos por los que estas respuestas inmunes atero-protectoras operan aún no se han esclarecido por completo. Sin embargo, una posibilidad probable es que el efecto atero-protector es mediado por anticuerpos generados contra estas secuencias de péptidos. Estos anticuerpos podrían, por ejemplo, facilitar la separación de partículas de LDL oxidativamente dañadas por parte de receptores Fc de macrófagos.

Receptores depuradores de macrófagos sólo reconocen LDL con un daño oxidativo extenso (9). Estudios recientes han identificado la existencia de LDL oxidada circulante (10,11). Estas partículas tienen sólo un daño oxidativo mínimo y no son reconocidas por los receptores depuradores. La unión de anticuerpos a estas partículas de LDL oxidadas circulantes puede ayudar a eliminarlas de la circulación antes de que se acumulan en el tejido vascular (12).

Varios estudios han apoyado el papel de los anticuerpos en la protección contra la aterosclerosis. La reconstitución de células B inhibe el desarrollo de la aterosclerosis en ratones esplenectomizados deficientes en apo E (13), así como la formación de neointima después de una lesión de la carótida en ratones RAG-1 (observaciones no publicadas de nuestro laboratorio). Además de ello, se ha demostrado que inyecciones repetidas de inmunoglobulinas reducen la aterosclerosis en ratones deficientes en apo E (6).

Tal como se comentó arriba, anticuerpos contra secuencias de péptidos modificadas con MDA en apo B-100 pueden ser generados por inmunización activa utilizando péptidos sintéticos. Este proceso requiere de 2-3 semanas antes de que se obtenga un efecto completo sobre la producción de anticuerpos.

En algunas situaciones puede ser necesario un efecto más rápido. Un ejemplo puede ser placas ateroscleróticas inestables, en las que es probable que LDL oxidada contribuya en la inflamación, toxicidad celular y riesgo de ruptura de la placa. Bajo estas circunstancias una inmunización pasiva mediante inyección de anticuerpos purificados, o producidos de manera recombinante contra secuencias nativas y modificadas con MDA puede tener un efecto más rápido.

- Otra situación en la que una inmunización pasiva por inyección de anticuerpos purificados, o producidos de manera recombinante puede ser eficaz es la cardiopatía coronaria en individuos de edad. Estudios de los autores de la invención han demostrado que una disminución en anticuerpos contra secuencias de péptidos de apo B se produce al aumentar la edad en el hombre y se asocia con un aumento en el nivel en plasma de LDL oxidada (Nordin Fredrikson, Hedblad et al). Esto puede sugerir una senescencia de las células inmunes responsables de la producción de anticuerpos contra antígenos en las LDL oxidadas, y el resultado en un aclaramiento defectuoso de partículas LDL dañadas por oxidación de la circulación. Por consiguiente, estos sujetos se beneficiarían más de una inmunización pasiva mediante la inyección de anticuerpos purificados o producidos de forma recombinante que de una inmunización activa con secuencias de péptidos de apo B-100.
- 5 Péptidos nativos sintéticos (Euro-Diagnostica AB, Malmö, Suecia) utilizados en lo que sigue eran péptido 1, 2 y 301 del banco de polipéptidos rastreado inicialmente. Se encontró que el péptido 1 (secuencia de aminoácidos: EEEMLENVSLVCPKDATRFK, n = 10) y el péptido 301 (secuencia de aminoácidos: HTFLIYITELLKKLQSTTVM, n = 10) tienen una mayor respuesta de anticuerpos IgG o IgM a la forma modificada con MDA de péptido nativo, respectivamente, y ambos títulos son más altos en sujetos sanos. Estos péptidos se eligieron en base a la suposición de que la respuesta de anticuerpos a estos péptidos podría ser protectora contra la aterosclerosis. El péptido 2 (secuencia de aminoácidos: ATRFKHLRKYTYNYEAESSS, n = 10) no provocó respuesta de anticuerpos en el rastreo inicial de anticuerpos, por lo que se eligió como péptido control. Los ratones que recibieron alumbre sirvieron como control (n = 9).
- 10 Ratones apo E (- / -) recibieron una inmunización primaria subcutánea a las 6-7 semanas de edad, seguida por un refuerzo intra-peritoneal 3 semanas más tarde. Los ratones fueron alimentados con dieta alta en colesterol desde el comienzo de la inmunización y continuó hasta su 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. Tampoco hubo diferencia estadísticamente significativa en el colesterol sérico según se mide utilizando un kit comercialmente disponible (Sigma). Sus niveles medios de colesterol en suero eran todos por encima de 715 mg/dl.
- 15 El área de la aorta descendente cubierta por la placa aterosclerótica se midió en una preparación "en face" después de la tinción con aceite rojo O. En comparación con el grupo control, los ratones inmunizados con los péptidos N° 2 y N° 301 habían reducido sustancialmente la aterosclerosis. La inmunización con el Péptido N° 1 no produjo una reducción significativa en la aterosclerosis en comparación con el control. En contraposición a la aorta descendente, la extensión de la aterosclerosis en la raíz aórtica y el arco aórtico no difirió entre los 4 grupos experimentales.
- 20 No hubo diferencias entre los 4 grupos en términos de tamaño de la placa del seno aórtico o de su contenido en lípidos (Tabla A). Tamaños de placa medios en los arcos aórticos de 4 grupos de ratones no eran diferentes. Sin embargo, la evaluación "en face" de tamaños de la placa descendente torácica y la aorta abdominal mediante tinción con aceite rojo O reveló que el grupo control y el grupo de Péptido N° 1 tenían una cantidad similar de placa aterosclerótica en la aorta, mientras que los grupos de péptidos N° 2 y N° 301 tenían una carga aterosclerótica significativamente reducida en la aorta (Tabla A). La observación de que la inmunización de péptidos no afectó al seno aórtico o al tamaño del arco de la placa aórtica, pero una placa aórtica descendente reducida es intrigante y sugiere que la inmunización de péptidos podría reducir la formación de placa nueva, pero no afecta a la progresión de las placas.
- 25 Se sometió a ensayo, además, si la inmunización de péptidos modula el fenotipo de las placas ateroscleróticas. Secciones congeladas de placas de los senos aórticos fueron teñidas inmunohistoquímicamente con anticuerpos de monocitos/macrófagos (MOMA-2, Serotec). En concordancia con los resultados de una observación "en face", el péptido N° 2 redujo significativamente la infiltración de macrófagos en las placas. La tinción con tricromo reveló un contenido medio en colágeno de $40,0 \pm 7,7\%$ en las placas de los senos aórticos del grupo de péptido 2; mientras que un contenido medio de colágeno en el grupo control alumbre, el grupo de péptido 1 y péptido 301 eran $32,3 \pm 5,3\%$, $35,6 \pm 8,5\%$ y $29,4 \pm 9,6\%$, respectivamente.
- 30 Se determinó la respuesta de anticuerpos contra péptido inmunizado en cada uno de los grupos. El título de anticuerpos después de la inmunización aumentó $6,1 \pm 3,1$ veces en el grupo de péptido 1, $2,4 \pm 1,0$ veces en el grupo de péptido 2 y $1,8 \pm 0,6$ veces en el grupo de péptido 301; mientras que el grupo de alumbre tuvo un incremento de $3,9 \pm 2,7$ veces del título de anticuerpos contra el péptido 1, $2,0 \pm 0,5$ veces mayor contra el péptido 2 y $2,0 \pm 0,9$ veces mayor contra el péptido 301. Es sorprendente que el incremento paralelo del título de anticuerpos contra péptidos inmunizados tanto en el grupo inmunizado como en el tratado con alumbre. Esto puede significar las siguientes posibilidades: (1) mecanismo(s) que no sean la respuesta inmune humoral (tal como la respuesta inmune celular) pueden estar implicados en la modulación de la aterosclerosis; o (2) este incremento de anticuerpo fue una respuesta espectadora a la hipercolesterolemia con el tiempo.
- 35 Aunque no hay un mecanismo especulativo claro para explicar por qué la inmunización peptídica reducía la arterioesclerosis y/o modula el fenotipo de placa, la novedad de esta invención es el concepto de utilizar péptidos de LDL como inmunógeno y su factibilidad como una estrategia de inmunomodulación. Esta estrategia de inmunización basada en péptidos modula las placas ateroscleróticas. La inmunización utilizando oxLDL homóloga o LDL nativa como antígeno ha demostrado reducir el tamaño de la placa¹⁻³, sin embargo, la disponibilidad, producción,
- 40
- 45
- 50
- 55

contaminación infecciosa y la seguridad de LDL homóloga humana que este enfoque sea poco atractivo para la aplicación clínica. Aquí se demuestra que la inmunoterapia basada en péptidos es factible, aunque los resultados finales difieren de la hipótesis inicial de los autores de esta invención de que la inmunización utilizando péptidos con mayor respuesta de anticuerpos IgM o IgG en sujetos normales puede proteger a los animales experimentales de desarrollar placas ateroscleróticas avanzadas.

Es sorprendente encontrar que la inmunización utilizando el péptido N° 2 protegía al animal de desarrollar nuevas lesiones ateroscleróticas en la aorta descendente y reducía la infiltración de macrófagos y un contenido de colágeno superior en placas, ya que este péptido no reproducía ninguna respuesta de anticuerpos del rastreo humano inicial. Puede ser debido a que (a) el péptido N° 2 puede ser una parte de la estructura de la proteína apo-B-100 humana que no fue expuesto al sistema inmune humano. Por lo tanto, no se generó ni detectó anticuerpo alguno de agrupaciones de suero humano sano; (b) la secuencia de aminoácidos del péptido N° 2 es ajeno a los ratones, por tanto, los ratones desarrollaron una respuesta inmunitaria contra este péptido, que modula la formación de nuevas lesiones ateroscleróticas y su fenotipo.

El efecto de la inmunización de LDL homóloga sobre el tamaño de la placa variaba cuando se evaluaron los tamaños de placa en diferentes porciones del árbol aórtico. Por ejemplo, Ameli et al mostraron que la inmunización de LDL nativa de conejo hipercolesterolémico resultaba en una reducción de la formación de placa en la aorta¹, mientras que Freigang et al. mostraron una reducción del tamaño de la placa en el seno aórtico, pero no en la aorta². Tomado sus conclusiones y las actuales juntas, se especuló que la inmunización de péptidos modula no sólo los tamaños de la placa, sino también la composición de la placa. El efecto reductor de la placa sólo se observó en la aorta descendente. Ratones apo E (- / -) son conocidos para desarrollar lesiones ateroscleróticas en las diversas etapas de la evolución en un solo animal, especialmente cuando fue alimentado con una dieta alta en colesterol. El aspecto inicial de la lesión aterosclerótica en un animal joven estaba en el seno aórtico^{6,7} y después de 15 semanas de dieta alta en colesterol las lesiones en los senos aórticos eran placas avanzadas; mientras que la fase temprana de la aterosclerosis estaba presente en la aorta descendente. ⁶Dado que el curso temporal de la maduración de la placa y el desarrollo en la aorta descendente es tardío comparado con el del seno aórtico, el hallazgo de que la inmunización redujo los tamaños de la lesión en la aorta descendente pero no en el seno aórtico sugirió que la inmunización afecta la fase temprana de la formación de la aterosclerosis. Es posible que a medida que los animales envejecían y en presencia de un nivel supra-fisiológico de colesterol en suero, el efecto de la inmunización reductora de la placa es superado por el efecto tóxico de la hipercolesterolemia. También es posible que las placas de los senos aórticos maduren más rápido y el sacrificio a las 25 semanas es demasiado tardío para detectar cualquier diferencia en el tamaño de la placa. Aunque el tamaño de la lesión no se moduló en la placa del seno aórtico, la inmunización con péptidos hizo modular las composiciones de la placa. El presente diseño experimental impidió el estudio de la composición de las placas en su fase temprana del desarrollo en la aorta descendente.

Los resultados experimentales ponen de manifiesto la viabilidad de utilizar secuencias de péptidos de apo B-100 asociada a LDL como inmunógenos para un nuevo enfoque para la prevención de la aterosclerosis y/o la modulación favorable del fenotipo de placa a pesar de la hiperlipidemia grave. Esta estrategia de inmunización basada en péptidos es potencialmente ventajosa frente al uso de oxLDL homóloga o LDL nativa como antígeno debido a que una estrategia de este tipo podría eliminar la necesidad de aislamiento y preparación de LDL homóloga y sus riesgos concomitantes para la contaminación. El efecto reductor de la placa de la inmunización con los péptidos N° 2 y 301 sólo se observó en la aorta descendente. Estos resultados son consistentes con los informes previos en los que donde también se ha demostrado que otras intervenciones terapéuticas tienen un mayor efecto sobre la aorta descendente en comparación con el arco aórtico¹⁴⁻¹⁷, presumiblemente debido a que las lesiones se desarrollan más rápidamente en la raíz aórtica y el arco que la aorta descendente, creando así una ventana más pequeña de oportunidad para la intervención^{14, 15, 16, 18, 19}. Dado que el curso temporal de la maduración y el desarrollo de la placa en la aorta descendente es tardío en comparación con el del seno aórtico y el arco aórtico, el hallazgo de que la inmunización reducía los tamaños de la lesión en la aorta descendente pero no en el seno aórtico y el arco sugieren que la inmunización evita preferiblemente una fase temprana de la formación de la aterosclerosis. Es posible que a medida que envejece el animal y en presencia de un nivel supra-fisiológico de colesterol en suero el efecto de la inmunización reductor de la placa es superado por el efecto tóxico de la hipercolesterolemia grave. Aunque el tamaño de la lesión no se moduló en el seno o arco aórtico, la inmunización con el Péptido N° 2 moduló la composición de la placa en una dirección favorable, creando un fenotipo de placa más estable con una infiltración reducida de macrófagos y un contenido incrementado de colágeno. En resumen, se demuestra un nuevo enfoque inmunomodulador basado en péptidos para la inhibición de la aterosclerosis en el modelo murino.

En resumen, se demuestra un nuevo enfoque inmunomodulador basado en péptidos en las placas ateroscleróticas moduladas. Aunque el cambio en la formación de la aterosclerosis en modelo de los autores de la invención fue sólo modesto, sin embargo, esta inmunización basada en péptidos puede proporcionar una herramienta alternativa en el estudio, prevención o tratamiento de la aterosclerosis.

Métodos

Preparación de péptidos. Los péptidos se prepararon utilizando el kit Imject® SuperCarrier® EDC (Pierce, Rockford, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con una ligera modificación. Un mg de péptido en 500 µl de

tampón de conjugación se mezcló con 2 mg de soporte en 200 µl de agua desionizada. Esta mezcla se incubó después con 1 mg de reactivo de conjugación (EDC, 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida HCl) a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, esto se dializó frente a fosfato de sodio 0,083 M, disolución 0,9 M de cloruro de sodio pH 7,2 durante la noche a 4°C. El conjugado dializado se diluyó con tampón de purificación en mezcla seca Imject hasta un volumen final de 1,5 ml. Se utilizó alumbre como inmunoadyuvante y se mezcló con el conjugado de péptido en la dilución 1:1 en volumen. La cantidad de péptido en cada una de las inmunizaciones fue de 33 µg/100 µl por inyección.

Protocolo animal. Ratones apo E (- / -) de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Me) recibieron una inmunización primaria subcutánea a las 6-7 semanas de edad, seguido por un refuerzo intraperitoneal 3 semanas más tarde. Los ratones fueron alimentados con dieta alta en colesterol desde el comienzo de la inmunización y se continuó hasta el sacrificio a la edad de 25 semanas. Muestras de sangre se recogieron 2 semanas después del refuerzo y en el momento del sacrificio. Los ratones que recibieron alumbre sirvieron como control. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional del Cedars-Sinai Medical Center. Todos los ratones fueron alojados en una instalación para animales acreditada por la Asociación Americana de Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio y se mantienen en un ciclo día/noche de 12 horas y tenían acceso ilimitado a agua y alimentos.

En el momento del sacrificio, los ratones fueron anestesiados por inhalación de enflurano. El plasma se obtuvo por sangrado retro-orbital antes del sacrificio.

Recolección de tejido y seccionamiento. Para evaluar el efecto de la inmunización del péptido sobre la formación de la aterosclerosis, se evaluó el tamaño de la placa en el seno aórtico, arco aórtico y aorta torácica y abdominal descendente. Después de perfundir el corazón y el árbol aórtico con solución salina normal a presión fisiológica, el corazón y la aorta proximal fueron extirpados y embebidos en compuesto OCT (Tissue-Tek) y se seccionaron congelados. Se recogieron secciones de 6 µm de espesor en serie desde la aparición de al menos 2 válvulas aórticas a la desaparición de las valvas de la válvula aórtica para la evaluación de la placa del seno aórtico. Típicamente 3 secciones consecutivas se dispusieron en un portaobjetos y se recogió 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 procesan de manera similar. La aorta torácica y abdominal descendente se procesaron por separado para la evaluación "en face" de la formación de placa después de la tinción con aceite rojo O.

Preparación *En face* de la aorta torácica y abdominal descendente. Albúmina de huevo de pollo (Sigma) en una concentración de 0,8 g/ml de agua se mezcló en la relación 1:1 con glicerol. Se añadió azida de sodio para dar una concentración final de azida de sodio de 0,2%. Después de limpiar de tejido y grasa circundante la aorta torácica y abdominal descendente, el segmento de la aorta desde la arteria subclavia izquierda hasta el nivel de la arteria renal se retiró cuidadosamente a continuación para la fijación durante la noche en Histochoice (Amresco). La aorta fue luego abierta longitudinalmente con cuidado y se colocó con el portaobjeto luminal sobre un portaobjetos recién recubierto con solución de albúmina de huevo. Después de secarse la solución de albúmina, la aorta se tiñó con aceite rojo O para evaluar el grado de aterosclerosis con histomorfometría asistida por ordenador.

Inmunohistoquímica e Histomorfometría. Las secciones de los senos aórticos fueron teñidas inmunohistoquímicamente con anticuerpo MOMA-2 (Serotec) utilizando el protocolo estándar. La tinción con tricromo para evaluar el contenido de colágeno y la tinción con aceite rojo O para el tamaño de la placa y el contenido de lípidos se realizaron utilizando un protocolo de tinción estándar. Se realizó un análisis morfométrico asistido por ordenador para evaluar la histomorfometría según se ha descrito previamente.⁸

Medición del título de anticuerpos. Para medir la respuesta de anticuerpos después de la inmunización con péptido, se desarrolló un ELISA. El título de anticuerpos contra el péptido inmunizado se midió utilizando sangre recogida a las 2 semanas después del refuerzo y en el sacrificio. La respuesta de anticuerpos contra 3 péptidos también se determinó en el grupo de alumbre en los mismos instantes. En síntesis, péptidos sintéticos nativos diluidos en PBS pH 7,4 (20 µg/ml) fueron absorbidos 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 Tween-20 al 0,05% (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 en la relación 1/50 en TBS-Tween-20 al 0,05% (TBS-T) durante 2 h a temperatura ambiente y luego durante la noche a 4°C. Después de aclarar, se detectó la deposición de anticuerpos dirigidos a los péptidos utilizando anticuerpos de conejo biotinilado anti-Ig de ratón (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 mediante estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. El uso de un kit de sustrato de fosfatasa (Pierce) desarrolló la reacción de color y la absorbancia a 405 nm se midió después de 1 h de incubación a temperatura ambiente. Se calcularon los valores medios después de sustraer el fondo.

Por supuesto, también son aplicables otros modelos de ensayo, tal como un inmunoensayo que detecta anticuerpos tal como un inmunoensayo radiactivo, transferencia Western y transferencia Southern, así como la detección de anticuerpos unidos a péptidos, electrodos enzimáticos y otros métodos para el análisis.

Estadísticas

5 Los datos se presentan como media ± estándar. El método estadístico utilizado está listado en cualquier texto, tabla o leyenda de figura. P < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

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

	Tamaño total de la placa en el seno aórtico (mm ²)	Zona de aceite rojo O (+) (% de placa del seno aórtico)	Tamaño de la placa del arco aórtico (mm ²)	% de placa en la aorta (prep. plano)
Alumbre	0,49±0,13	21,7±4,4	0,057±0,040	20±4,7
Péptido 1	0,48±0,14	32,0±8,1	0,054±0,027	17±4,3
Péptido 2	0,52±0,12	23,9±3,5	0,078±0,022	6,3±1,9*
Péptido 301	0,46±0,16	23,8±4,1	0,050±0,024	8,9±2,2*

* * Significativamente diferente del grupo de alumbre. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA seguido del ensayo de Tukey-Kramer.

10 Datos adicionales sobre el efecto de inmunización con secuencias de péptidos de la apolipoproteína B-100 sobre la aterosclerosis en ratones inactivados en apo E se dan a continuación en la Tabla B

Tabla B

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

Inmunización utilizando 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 utilizando una sola secuencia de péptidos

- 1. Secuencia de péptido 2 -67,7%
- 2. Secuencia de péptido 210 -57,9%
- 3. Secuencia de péptido 301 -55,2%

Efecto sobre la aterosclerosis en la aorta

4. Secuencia de péptido 45	-47,4%
5. Secuencia de péptido 74	-31,0%
6. Secuencia de péptido 1	-15,4%
7. Secuencia de péptido 240	0%

La administración de los péptidos se lleva a cabo normalmente mediante inyección tal como inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular o inyección intraperitoneal. Una primera dosificación de inmunización puede ser de 1 a 100 mg por paciente dependiendo del peso corporal, la edad y otras condiciones físicas y médicas. En situaciones particulares, también es posible una administración local de una disolución que contiene uno o más de los péptidos a través de catéter a los vasos coronarios. Pueden contemplarse también preparaciones orales, aunque deben tomarse precauciones particulares para admitir la absorción en el torrente sanguíneo. Una dosificación de inyección puede contener 0,5 a 99,5% en peso de uno o más de los fragmentos o péptidos de la presente invención.

Los péptidos se administran normalmente como ligados a albúmina de suero bovino cationizada, y utilizando hidróxido de aluminio como adyuvante. Se pueden utilizar también otros adyuvantes conocidos en la técnica.

Disoluciones para la administración de los péptidos no contendrán EDTA ni antioxidantes.

Los péptidos también se pueden utilizar como agentes terapéuticos en pacientes que ya padecen aterosclerosis. Así, se puede utilizar cualquier vía de administración apropiada para la adición de uno o más de los fragmentos o péptidos de la invención.

Estudios iniciales se centraron en la determinación de qué tipo de modificaciones oxidativas de los péptidos conducían al reconocimiento por parte de anticuerpos en el plasma humano. Estos estudios se realizaron utilizando los péptidos 1-5 y 297-302. Durante la oxidación de LDL, ácidos grasos poliinsaturados en fosfolípidos y ésteres de colesterol se ven sometidos a una peroxidación que conduce a la formación de productos de descomposición altamente reactivos tales como malon-dialdehído (MDA). MDA puede entonces formar aductos covalentes con residuos lisina e histidina en apo B-100, haciéndola altamente inmunogénica. La oxidación de LDL también resulta en la fragmentación de la apo B-100 que pueden conducir a la exposición de secuencias de péptidos normalmente no accesibles para el sistema inmune. En estos experimentos se utilizaron péptidos en su estado nativo, después de modificación con MDA o después de la incorporación en liposomas de fosfolípidos, seguido de la oxidación de cobre o la modificación con MDA. Anticuerpos IgM se identificaron contra péptidos nativos y oxidados con MDA y liposomas, con títulos de anticuerpos MDA-péptido > péptidos liposomas modificados con MDA > péptido oxidado con liposoma > péptido nativo. Especificidad el ensayo demostró que la unión de anticuerpos a péptidos modificados con MDA se compitió tanto por MDA-LDL y LDL oxidada con cobre.

A continuación, los autores de la invención realizaron un rastreo del banco de péptidos completo utilizando plasma agrupado, derivado de sujetos control sanos y péptidos nativos y modificados con MDA como antígenos. Se identificaron anticuerpos para un gran número de sitios en apo B-100. Utilizando dos veces la absorbancia del control de fondo como corte del título positivo, se detectaron anticuerpos contra 102 de los 302 péptidos que constituyen la secuencia completa de apo B-100. La unión de IgM era sustancialmente más abundante que la de IgG. Generalmente, la unión era superior a secuencias de péptidos modificadas con MDA que a la secuencia nativa correspondiente, pero esto era una correlación sorprendente entre las dos. La unión a las secuencias nativas y modificadas con MDA se compitió por la adición de LDL modificada con MDA y LDL oxidada con cobre, pero no por LDL nativa. Estas observaciones sugieren que las respuestas inmunitarias contra secuencias de péptidos modificadas con MDA en apo B-100 da como resultado una reactividad cruzada contra secuencias nativas. La incapacidad de LDL nativa de competir por la unión del anticuerpo a secuencias de péptidos de apo B-100 nativos es intrigante, pero puede indicar que estas secuencias sólo quedan expuestas después de la degradación proteolítica de apo B-100 que se produce como resultado de la oxidación de LDL. Las dos partes hidrófilas e hidrófobas de la molécula fueron reconocidas por anticuerpos. Se realizó un segundo rastreo del banco de péptidos de apo B-100 utilizando plasma agrupado de sujetos con síntomas clínicos de enfermedad coronaria del corazón (CHD, infarto agudo de miocardio (AMI) y angina inestable; n = 10). Los anticuerpos en plasma de CHD agrupado se unían a las mismas secuencias y con la misma distribución global que los anticuerpos en el plasma de control sano. Sin embargo, los títulos de anticuerpos a varios péptidos (nºs 1, 30-34, 100, 107, 148, 149, 162, 169, 236, 252 y 301) fueron al menos dos veces tan altos como en el plasma de control en comparación con el plasma de sujetos de CHD, mientras que los títulos contra unos pocos péptidos (nºs 10, 45, 111, 154, 199, 222 y 240) eran más altos en el plasma de pacientes de CHD en comparación con los controles. A continuación, los autores de la invención realizaron un estudio clínico prospectivo para investigar si los niveles de anticuerpos contra secuencias de péptidos modificados con MDA en apo B-100 predicen un riesgo de desarrollar CHD. El uso de un diseño de caso de control

anidado se seleccionaron 78 sujetos con eventos coronarios (AMI o muerte debida a CHD) y 149 controles del Estudio de Malmö Diet Cancer. Ni los casos ni los individuos control tenían un historial de MI (infarto de miocardio) previo o un derrame cerebral. El tiempo medio desde la inclusión del evento coronario agudo era de 2,8 años (intervalo de 0,1-5,9 años) entre los casos. Los niveles de anticuerpos se determinaron en muestras de plasma de línea de base suplementados con antioxidantes. Utilizando el grosor íntima-media carotídeo (IMT) según se evalúa mediante ultrasonografía en la línea base, los autores de la invención también analizaron las asociaciones entre los niveles de anticuerpos y el grado de enfermedad vascular existente. Estudiaron 8 secuencias de péptidos modificadas con MDA que en los estudios de rastreo inicial se asociaron con niveles elevados de anticuerpos en el plasma (n^{os} 74, 102 y 210) y/o diferencias marcadas entre el control y las agrupaciones de plasma CHD (n^{os} 32, 45, 129, 162 y 240). Se encontró que los controles tenían mayores niveles de IgM contra el péptido de MDA 74 (0,258, intervalo de 0-1,123 unidades de absorbancia frente a 0,178, intervalo de 0-0,732 unidades de absorbancia, $p < 0,05$), por lo demás no se observaron diferencias en los niveles de anticuerpos entre los casos y controles. Las asociaciones entre IMT e IgM contra los péptidos de MDA n^{os} 102, 129 y 162 ($r = 0,233, 0,232$ y $0,234$, respectivamente, $p < 0,05$) se observaron en los casos entre IMT y el péptido de MDA 45 ($r = 0,18, p < 0,05$) en los controles. Se observaron correlaciones débiles entre los anticuerpos contra el péptido de MDA 129 y el colesterol total y LDL ($r = 0,19$ y $r = 0,19, p < 0,01$, respectivamente), de lo contrario los niveles de anticuerpos de péptidos no mostraron asociación alguna con el colesterol total en plasma, colesterol LDL, colesterol HDL o triglicéridos en plasma. Hubo fuertes co-variaciones entre los niveles de anticuerpos contra los diferentes péptidos (valores de r entre 0,6 y 0,9). La única excepción fue anticuerpos contra el péptido de MDA 74 que estaban débilmente o nada en absoluto relacionado con anticuerpos contra los otros péptidos.

Los anticuerpos contra todas las secuencias excepto péptido de MDA 74 se asoció inversamente con la edad entre los casos (valores r que oscilan entre -0,38 y -0,58, $p < 0,010,001$), pero no en los controles. Los niveles plasmáticos de LDL oxidada, por el contrario, aumentaron con la edad. De nuevo, esta asociación era más fuerte en los casos que en los controles. Para investigar si las asociaciones entre las respuestas inmunes contra secuencias de péptidos modificados con MDA y la enfermedad cardiovascular eran diferentes en diferentes grupos de edad se realizó un análisis de subgrupos en los casos y los controles por debajo y por encima de la edad mediana (61 años). En los casos del grupo de edad más joven, habían aumentado los niveles de anticuerpos contra los péptidos 32 y 45 y habían disminuido los niveles de anticuerpos contra el péptido 74, en comparación con los controles, mientras que no se observaron diferencias en el grupo de edad más avanzada. Los anticuerpos contra todas las secuencias de péptidos de MDA, excepto el péptido 74, se asociaron significativamente con el IMT en el grupo de edad más joven, pero no en el de más edad (Tabla).

Estos estudios identifican un cierto número de secuencias modificadas con MDA en apo B-100 que son reconocidas por anticuerpos humanos. La modificación con MDA de apo B-100 se produce como resultado de la oxidación de LDL, lo que indica que estos anticuerpos pertenecen a la familia de auto-anticuerpos de LDL oxidada previamente descritos. Esta noción también es apoyada por la observación de que la unión del anticuerpo a los péptidos de apoB-100 modificada con MDA compite por la adición de LDL oxidada. Junto con los fosfolípidos oxidados identificados por Hörkkö et al, es probable que estas secuencias de péptidos modificados con MDA constituyan la gran mayoría de las estructuras antigénicas en LDL oxidada. En similitud con los anticuerpos anti-fosfolípidos de LDL oxidada, los anticuerpos contra las secuencias de apoB-100 modificadas con MDA eran de tipo IgM. Esto puede sugerir que también los últimos anticuerpos pertenecen a la familia de anticuerpos naturales T 15. A los anticuerpos T 15 se les ha atribuido un papel importante en la defensa independiente temprana de células T contra las infecciones bacterianas, así como en la separación de células apoptóticas. Queda por determinar si los anticuerpos contra péptidos de MDA aquí descritos tienen funciones similares. También se identificaron anticuerpos contra un gran número de secuencias de apo B-100 nativas. Sin embargo, la co-variación notable entre anticuerpos contra secuencias nativas y secuencias modificadas con 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 modificados con MDA reaccione de forma cruzada con la secuencia nativa correspondiente. Si los anticuerpos contra las secuencias de apo B-100 nativas se unen también a las partículas de LDL nativas, es probable que tengan una influencia importante en el metabolismo de LDL. Sin embargo, el hallazgo de que la LDL nativa no compite por la unión del anticuerpo a secuencias de apo B-100 nativas, así como la falta de correlación entre los anticuerpos contra las secuencias de apo B-100 nativas y los niveles de colesterol LDL contra la existencia de un fenómeno de este tipo

Anticuerpos contra secuencias de péptidos modificados con MDA disminuyeron progresivamente con la edad en los casos, pero no en los controles. Con la excepción del péptido de MDA 74, los anticuerpos IgM contra péptidos de MDA se asociaron significativamente con el IMT carotídeo en el grupo de edad más joven (menos de 62 años), pero no en el grupo de mayor edad. Estos hallazgos sugieren que los 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 los individuos más jóvenes el proceso de la enfermedad aterosclerótica esté en una etapa más activa con una implicación más destacada de las células inmunes. Otra posibilidad es que los niveles disminuidos de anticuerpos contra secuencias de péptidos modificados con MDA en sujetos de mayor edad reflejen una senescencia de las células inmunitarias implicadas en la aterosclerosis. Se ha propuesto una función alterada de las células inmunes debido a inmunosenescencia de contribuir en una susceptibilidad incrementada a las infecciones y al cáncer en la población de más edad. Curiosamente, la inmunosenescencia es inhibida por antioxidantes que

indican una implicación del estrés oxidativo. Es probable que las células inmunes que interactúan con epítomos en la LDL oxidada queden particularmente expuestas a un estrés oxidativo. Dado que la LDL oxidada está presente en las arterias ya a una edad muy temprana, esta respuesta inmune están siendo desafiada continuamente durante varias décadas, que puede contribuir además en un desarrollo de la inmunosenescencia.

5 Se encontró que los anticuerpos incrementados contra dos sitios en apo B-100 predicen el riesgo de infarto de miocardio y la muerte coronaria en sujetos por debajo de 62 años de edad. Anticuerpos contra estos sitios mostraron un alto nivel de co-variación, lo que sugiere que se produjeron en respuesta a los mismos procesos fisiopatológicos subyacentes. El hecho de que el tiempo medio desde la toma de muestras de sangre al evento coronario fuese de sólo 2,8 años hace a estos anticuerpos particularmente interesantes como los responsables de un riesgo incrementado de CHD. Los niveles de anticuerpos contra secuencias de péptidos de apoB-100 modificados con MDA no mostraron asociación alguna con otros factores de riesgo de CHD tales como la hiperlipidemia, la hipertensión y la diabetes, lo que sugiere que son marcadores independientes de riesgo de CHD. Los casos de CHD en el presente estudio no eran individuos de extremadamente alto riesgo y en este sentido, representativos del paciente de CHD común. El hallazgo de que la IgM contra las de apoB-100 modificadas con MDA predice el riesgo a corto plazo para el desarrollo de eventos coronarios agudos en los individuos que no han sido identificados como de alto riesgo mediante el rastreo de factores de riesgo establecidos, sugiere que puede convertirse en un instrumento útil en la identificación de individuos que necesitan un tratamiento preventivo agresivo. Sin embargo, se requieren estudios prospectivos considerablemente mayores con un análisis multivariado antes de que pueda ser plenamente establecido el valor clínico de anticuerpos determinantes contra las secuencias de péptidos de apo B-100 modificados con MDA. Otra limitación del presente estudio clínico es que los autores de la invención sólo han analizado anticuerpos contra un pequeño número de los sitios antigénicos en apo B-100 y que los títulos de anticuerpos contra otros sitios pueden ser aún mejores marcadores de riesgo cardiovascular.

En sujetos por debajo de la edad de 60, anticuerpos contra un gran número de sitios modificados con MDA en apo B-100 se correlacionaron con el grado de la enfermedad vascular existente según se evalúa mediante el IMT carotideo. Anticuerpos IgM estaban más estrechamente asociados al IMT carotideo que los anticuerpos IgG. Aunque el IMT carotideo tiene limitaciones obvias como una medida de la carga aterosclerótica en general, estas observaciones siguen sugiriendo que la determinación de IgM contra secuencias modificadas con MDA en apo B-100 puede ser un método para evaluar la gravedad de la aterosclerosis existente. Estas observaciones están también en línea con varios estudios previos que han reseñado asociaciones entre la enfermedad coronaria y de la arteria carótida y anticuerpos IgM contra LDL oxidada.

Los anticuerpos contra el péptido 74 diferían de otros anticuerpos contra péptidos de apo B-100 en muchos aspectos. Eran más altos en los controles que en los casos, no disminuían con la edad y no se asociaban con el grado de enfermedad carotídea. Por consiguiente, los anticuerpos contra esta secuencia de péptidos representan candidatos interesantes para una respuesta inmune atero-protectora.

35 Una cuestión importante es por qué se producen estas asociaciones. Las mismas demuestran claramente que las respuestas inmunitarias contra sitios apo B-100 modificados con MDA están implicadas de alguna manera con el proceso de la enfermedad aterosclerótica. Dado que los altos niveles de anticuerpos están asociados con una aterosclerosis más grave y un riesgo incrementado de desarrollo de eventos coronarios agudos, una posibilidad obvia es que estas respuestas inmunitarias fomentan la aterogénesis. Estudios demuestran que las respuestas inmunes contra las proteínas de choque térmico tal como HSP 65, que son aterogénicas proporcionan un cierto apoyo a esta noción. Sin embargo, los estudios experimentales con animales han demostrado un efecto atero-protector de la inmunización con LDL oxidada. La reconstitución de células B de ratones deficientes en apo E esplenectomizados resulta en una disminución de la aterosclerosis. Una aterosclerosis reducida también se ha observado en ratones deficientes en apo E a los que se suministraron inyecciones repetidas de inmunoglobulina. Las presentes observaciones no necesariamente argumentan en contra de un papel atero-protector de las respuestas inmunes contra las LDL oxidadas. Estas respuestas inmunes se activan mediante procesos pro-aterogénicos tales como la oxidación de LDL. Por consiguiente, también es probable que estén en proporción a la gravedad del proceso de la enfermedad y podrían servir como creadores de la gravedad de la enfermedad y el riesgo de CHD sin contribuir en el progreso de la enfermedad. El hallazgo de que la inmunización de ratones deficientes en apo E con secuencias de péptidos de apo B-100 inhibe el desarrollo de la aterosclerosis reseñada en dos documentos acompañantes que demuestran que es probable que éste sea el caso. De hecho, el resultado más importante del presente estudio bien puede ser la identificación de estructuras que podrían ser utilizadas como componentes de una vacuna contra la aterosclerosis. La observación de que la disminución en anticuerpos contra secuencias de péptidos modificados con MDA en apo B-100 que se produce con la edad va acompañada de un aumento en los niveles plasmáticos de LDL oxidada, sugiere que un aumento del aclaramiento de LDL mínimamente oxidada de la circulación puede ser un mecanismo por el que estos anticuerpos podrían proteger frente a la aterosclerosis.

Métodos

Población de estudio

Los sujetos del estudio, nacidos entre 1926 y 1945, pertenecen al cohorte del estudio de "Malmö Diet and Cancer (MDC)". Un 50% aleatorio de los que entraron en el estudio MDC entre noviembre de 1991 y febrero de 1994 fueron invitados a participar en un estudio sobre la epidemiología de la enfermedad de la arteria carótida. Se han reseñado rutinas para la comprobación de la información sobre morbilidad y mortalidad tras el examen de la salud, así como la definición de los factores de riesgo tradicionales.

Se identificaron ochenta y cinco casos de eventos cardíacos coronarios agudos, es decir, MI fatal o no fatal o muerte por enfermedad coronaria (CHD). Los participantes que tenían un historial de infarto de miocardio o un accidente cerebrovascular ($n = 6$) no eran elegibles para el presente estudio. Para cada uno de los casos dos controles sin historial de infarto de miocardio o accidente cerebrovascular se emparejaron individualmente por edad, sexo, hábito de fumar, la presencia de hipertensión y mes de participación en el examen de rastreo y duración del seguimiento. Debido a razones de logística (no estaban disponibles muestras de sangre en cantidad suficiente para la evaluación de los péptidos) sólo control estaba disponible para siete casos y no hay controles para un caso. Este caso se excluyó del análisis. Así, la población de estudio consiste en 227 sujetos, 78 casos y 149 controles, de edades de 49-67 años (mediana 61) en la línea base.

15 Análisis de laboratorio

Después de ayunar durante la noche, se tomaron muestras de sangre para la determinación de los valores séricos de colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL y glucosa en sangre entera. El colesterol LDL en mmol/L se calculó según la fórmula de Friedewald. La LDL oxidada se midió mediante ELISA (Mercordia).

Vasculografía por ultrasonidos en modo B

20 Se utilizó un sistema de tomografía computarizada Acuson 128 (Acuson, Mountain View, California) con un transductor MHz para la evaluación de las placas carotídeas en la arteria carótida derecha tal como se describió previamente.

Desarrollo de ELISAs contra secuencias de péptidos de apo B-100

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

35 Una mezcla de fosfatidilcolina de huevo (EPC) (Sigma) y fosfatidilserina (PS) (Sigma) en una solución de cloroformo a una relación molar de 9:1 y una concentración de 3 mM de fosfolípidos (PL) se evaporó en un recipiente de vidrio bajo una corriente de argón suave. El recipiente se colocó después bajo vacío durante 3 horas. Una disolución que contiene péptido 0,10 mM (5 ml) en tampón HEPES 10 mM pH 7,4, filtrado en condiciones estériles, NaCl 145 mM y azida de sodio al 0,003% se añadió a la película secada de EPC/PS y se incubó durante 15 min a 50°C. La mezcla fue suavemente sometida a un vórtice durante aproximadamente 5 min a temperatura ambiente y luego se colocó en un baño de agua enfriada con hielo y se trató con ultrasonidos con 7,5 micras 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 con MDA 0,5 M durante 3 h a 37°C o CuCl_2 5 mM durante 18 h a 37°C, se almacenó bajo argón en viales de vidrio a 4°C envueltos en papel de aluminio y se utilizó en el espacio de 1 semana. La mezcla modificada con MDA fue dializada contra PBS que contenía EDTA 1 mM con varios cambios durante 18 h a 4°C antes de su almacenamiento. La modificación de la mezcla se sometió a ensayo en geles de poliacrilamida desnaturalizada (BioRad Laboratories AB, Sundbyberg, SE), adecuados para la separación de péptidos.

45 Péptidos sintéticos nativos o modificados diluidos en PBS pH 7,4 (20 leg/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 en cada una de las placas. Después de lavar con PBS que contenía Tween-20 al 0,05% (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 agrupado, AHP o NHP, diluido 1/100 en TBS-Tween-20 al 0,05% (TBS-T) durante 2 h a temperatura ambiente y luego durante la noche a 4°C. Después de aclarar, la deposición de auto-anticuerpos dirigidos contra los péptidos se detectó mediante el uso de anticuerpos IgG o IgM anti-humanos de conejo 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 mediante estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. La reacción de color se desarrolló utilizando 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 fueron divididos por el valor de absorbancia de P6 y se compararon.

Estadísticas

5 SPSS se utilizó para los análisis estadísticos. Los resultados se presentan como mediana e intervalo y como proporciones cuando sea apropiado. El diagrama de caja y diagramas de dispersión fueron utilizados para ilustrar la relación entre la edad y los péptidos seleccionados entre los casos y los controles correspondientes. Gráficos correspondientes también se utilizaron para ilustrar la relación entre la edad y los péptidos seleccionados, casos y controles, respectivamente, por debajo y por encima de la mediana de edad (61 años) en la línea base y por separado para los casos y los controles por debajo de la mediana de edad. En casos y controles, por separado, los coeficientes de correlación parcial, ajustadas por edad y sexo, se computaron entre péptidos seleccionados y los niveles de lípidos en sangre y la IMT carotídea común. También se computaron coeficientes de correlación parcial, ajustados por edad y sexo, entre la IMT carotídea común y péptidos seleccionados en los casos y los controles por debajo y por encima de la edad mediana. Se utilizó un test-t de muestra independiente para evaluar las variables continuas con distribución normal y un test de chi-cuadrado para proporciones entre casos y controles. Se utilizó el test no paramétrico (de Mann-Whitney) para evaluar las variables continuas no distribuidas normalmente entre casos y controles. Todos los valores de p son de doble cola.

15 Tabla

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

PÉPTIDO	CASOS más CONTROLES	CASOS más CONTROLES
	<u>Edad 49-61 años, n = 116</u>	<u>Edad 62-67 años, n =111</u>
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; \$/×0,01

REFERENCIAS

1. Ameli Set al. Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16,1074-1079 (1996)
- 5 2. Freigang S, Hörkkö S, Miller E, Witztum J.L. y 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 et al. Hyperimmunization of apo-E-deficient mice with homologous malondialdehyde low-density lipoprotein suppresses early atherogenesis. *Atherosclerosis* 138,147-152 (1998)
- 10 4. Alving C.R. et al. 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. y Hansson G.K. LDL immunization induces T-cell-dependent antibody formation and protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21,108-114 (2001)
- 15 6. Nakashima Y, Plump A.S., Raines E.W., Breslow J.L. y 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. y Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* 14,141-147 (1994)
8. Shah P.K. et al. Effects of recombinant apolipoprotein A-I(Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 97,780-785 (1998)
- 20 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. y Collen, D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 98, 1487-94 (1998).
- 25 11. Ehara, S. et al. 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).
- 30 16. Chobanian, A.V., Haudenschild, C.C., Nickerson, C. y Drago, R. Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension* 15, 327-31. (1990).
17. Inoue, I. et al. Macrophage colony stimulating factor prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis* 93, 245-54. (1992).
- 35 18. Bourassa, P.A., Milos, P.M., Gaynor, B.J., Breslow, J.L. y Aiello, R.J. Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E- deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10022-7. (1996).
19. Sparrow, C.P. et al. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 115-21. (2001).
20. Nakashima, Y., Plump, A.S., Raines, E.W., Breslow, J.L. y Ross, R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14, 133-40. (1994).
- 40 21. Palinski, W. et al. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb* 14, 605-16. (1994).

LEYENDAS DE FIGURAS

- 45 Las Figuras 1-6 muestran la respuesta de anticuerpos a los diferentes péptidos preparados de acuerdo con la presente invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Forskarpatent i Syd AB
 Cedars-Sinai Medical Center

5 <120> TERAPIA DE INMUNIZACIÓN BASADA EN PÉPTIDOS PARA EL TRATAMIENTO DE
 ATEROSCLEROSIS Y DESARROLLO DEL ENSAYO BASADO EN PÉPTIDO PARA LA DETERMINACIÓN
 DE RESPUESTAS INMUNES CONTRA LIPOPROTEÍNA OXIDADA DE BAJA DENSIDAD

<130> (Nueva divisional EP)

<150> SE 0101232-7

< 151> 05-04-2001

10 <150> SE 0103754-8

< 151> 09-11-2001

<150> EP 08158141.5

15 < 151> 05-04-2002

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

20 < 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

25 <400> 1

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

30 <210> 2

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

35 <220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

ES 2 546 293 T3

<400> 2

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

5

<210> 3

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

10

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 3

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

15

Ala His Trp Ser
20

<210> 4

< 211> 20

< 212> PRT

20

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

25

<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

<210> 5

30

< 211> 20

< 212> PRT

ES 2 546 293 T3

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

5 <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

<210> 6

10 < 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

15 < 223> Fragmento de apolipoproteína B

<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

20 <210> 7

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

25 <220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 7

30 < 211> 20

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

ES 2 546 293 T3

<210> 8
< 211> 20
< 212> PRT
5 < 213> Secuencia Artificial

<220>
< 223> Fragmento de apolipoproteína B

10 <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

<210> 9
15 < 211> 20
< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

20 <220>
< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 9

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

25 Ala Ser Leu Lys
20

<210> 10
< 211> 20
< 212> PRT
30 < 213> Secuencia Artificial

<220>
< 223> Fragmento de apolipoproteína B

ES 2 546 293 T3

<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

5 <210> 11

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

10 <220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 11

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

15 Ala Asp Tyr Glu
20

<210> 12

< 211> 20

< 212> PRT

20 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

25 <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

<210> 13

< 211> 20

30 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

ES 2 546 293 T3

<220>
< 223> Fragmento de apolipoproteína B

5 <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

<210> 14

10 < 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

15 <220>
< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<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

20 <210> 15

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

25 <220>
< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<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

ES 2 546 293 T3

<210> 16

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

5

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 16

10

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

<210> 17

< 211> 20

15

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

20

<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

25

<210> 18

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

30

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 18

ES 2 546 293 T3

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

<210> 19

5 < 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

10 < 223> Fragmento de apolipoproteína B

<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

15

<210> 20

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

20

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 20

25

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

<210> 21

< 211> 20

30 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

ES 2 546 293 T3

<220>
< 223> Fragmento de apolipoproteína B

5 <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

<210> 22

10 < 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

15 <220>
< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<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

20

<210> 23

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

25

<220>
< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 23

30

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

ES 2 546 293 T3

<210> 24

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

5

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 24

10

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

15

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

20

<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

25

<210> 26

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

30

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 26

ES 2 546 293 T3

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

<210> 27

5 < 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

10 < 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 27

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

15

<210> 28

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

20

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 28

25

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> 29

< 211> 20

30 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

ES 2 546 293 T3

<220>
< 223> Fragmento de apolipoproteína B

5 <400> 29

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> 30

10 < 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

15 <220>
< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 30

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

20 <210> 31

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

25 <220>
< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 31

30 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

ES 2 546 293 T3

<210> 32

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

5

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 32

10

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

<210> 33

< 211> 20

15

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

20

<400> 33

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

25

<210> 34

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

30

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 34

ES 2 546 293 T3

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

<210> 35

5 < 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

10 < 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 35

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

15

<210> 36

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

20

<220>

< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 36

25

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

<210> 37

< 211> 20

30 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

ES 2 546 293 T3

<220>
< 223> Fragmento de apolipoproteína B

5 <400> 37

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> 38

10 < 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

15 <220>
< 223> Fragmento de apolipoproteína B

<400> 38

Ala Thr Arg Phe Lys His Leu Arg Lys Tyr Thr Tyr Asn Tyr Gln Ala
1 5 10 15

Gln Ser Ser Ser
20

20

REIVINDICACIONES

1. El péptido KTTKQSFDSLVSVAQYKKNKH (SEQ ID N°: 14), un epítipo contenido en el péptido, una forma oxidada del mismo o un derivado de aldehído o malon-dialdehído del mismo.
- 5 2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido está en forma nativa.
3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido es un hapteno del derivado de aldehído.
4. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido está en una forma oxidada, incluida una forma oxidada en donde el péptido ha sido oxidado utilizando cobre.
- 10 5. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en forma de un derivado de malon-dialdehído (MDA) del mismo, o en forma de un derivado hidroxinonenal del mismo.
6. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el péptido es una combinación con liposomas de fosfolípidos.
7. Un anticuerpo purificado o producido de forma recombinante contra el péptido nativo y/o modificado con MDA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 15 8. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el anticuerpo purificado o producido de forma recombinante de acuerdo con la reivindicación 7, para uso en medicina.
9. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en diagnosticar la presencia o ausencia de anticuerpos relacionados con un riesgo incrementado o disminuido de desarrollar la aterosclerosis o una enfermedad cardiovascular isquémica seleccionada de enfermedad del corazón coronaria, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y/o enfermedad arterial periférica.
- 20 10. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
11. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, para uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la aterosclerosis o enfermedades cardiovasculares isquémicas en un mamífero, incluido un ser humano, en donde la enfermedad cardiovascular isquémica es una enfermedad del corazón coronaria, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y/o enfermedad arterial periférica.
- 25 12. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en donde la composición está en una forma inyectable.
- 30 13. Una vacuna para uso en la inmunización de un mamífero, incluidos seres humanos, contra la aterosclerosis, comprendiendo la vacuna el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
14. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 13, en donde una dosis de inmunización es de 1 a 100 mg del péptido.
- 35 15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 o la vacuna de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende, además, uno o más adyuvantes.

Péptidos 1-100 modificados con MDA, anticuerpos IgG

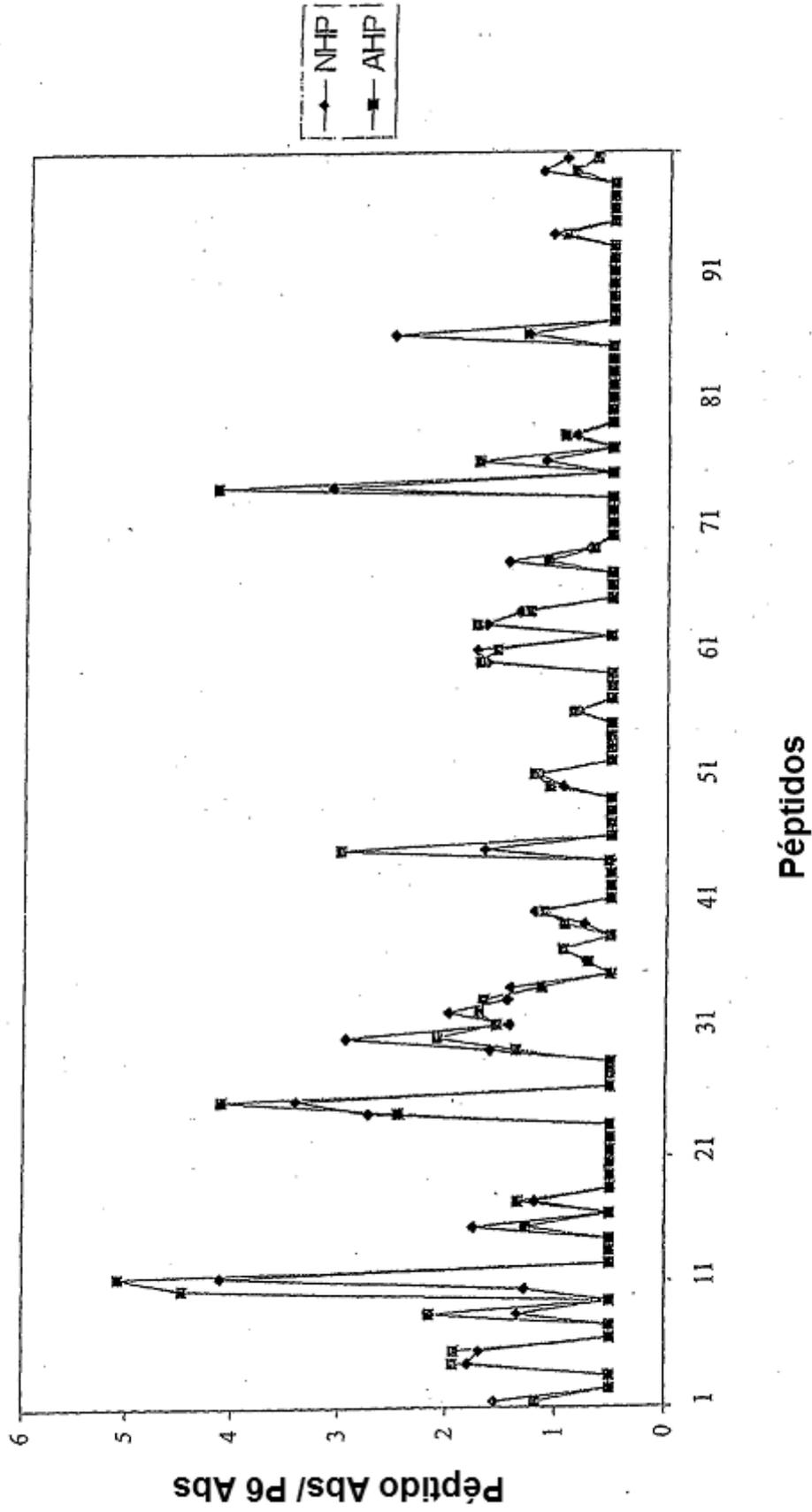


FIG. 1

Péptidos 101-200 modificados con MDA, anticuerpos IgG

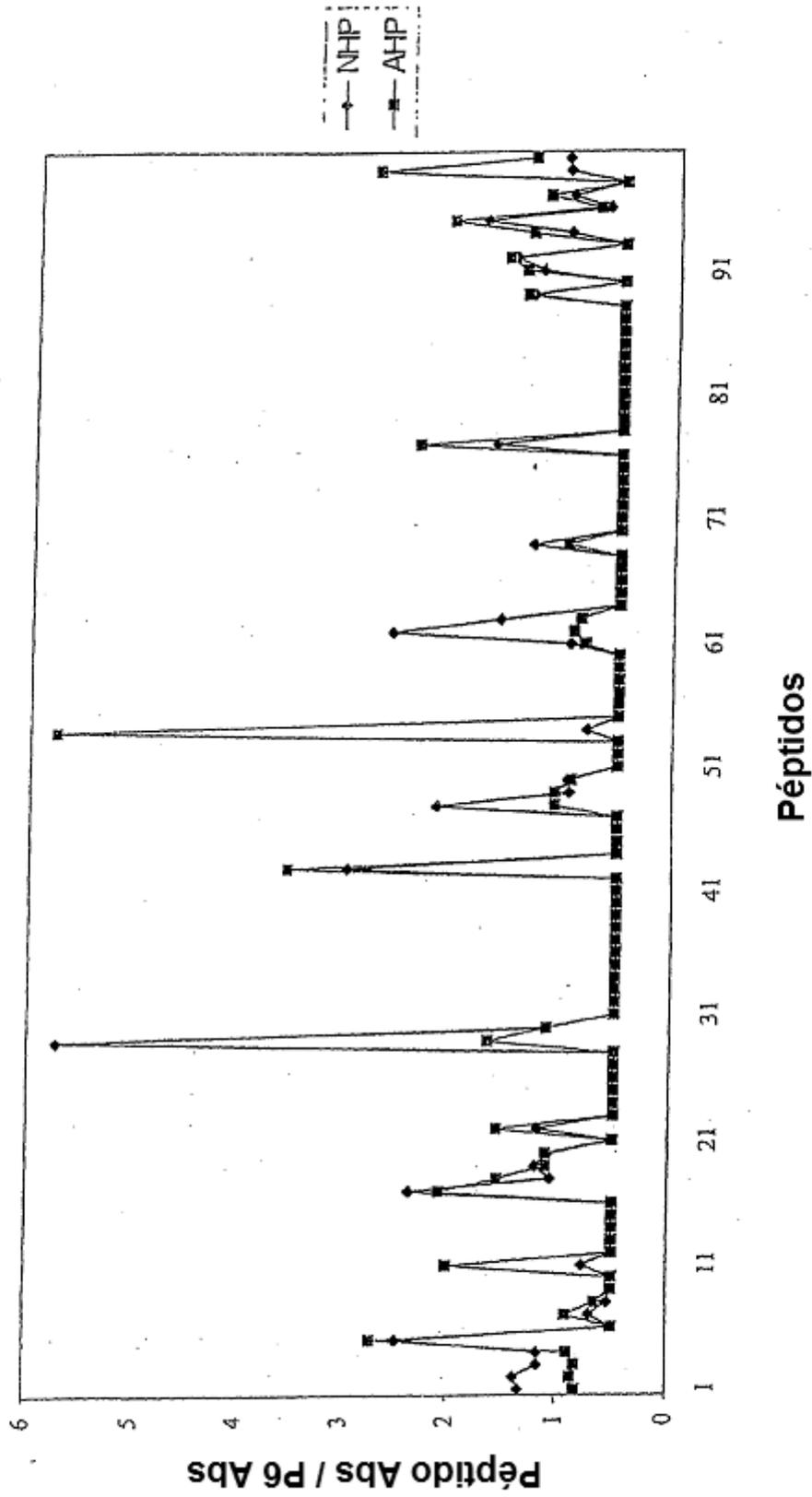


FIG. 2

Péptidos 201-302 modificados con MDA, anticuerpos IgG

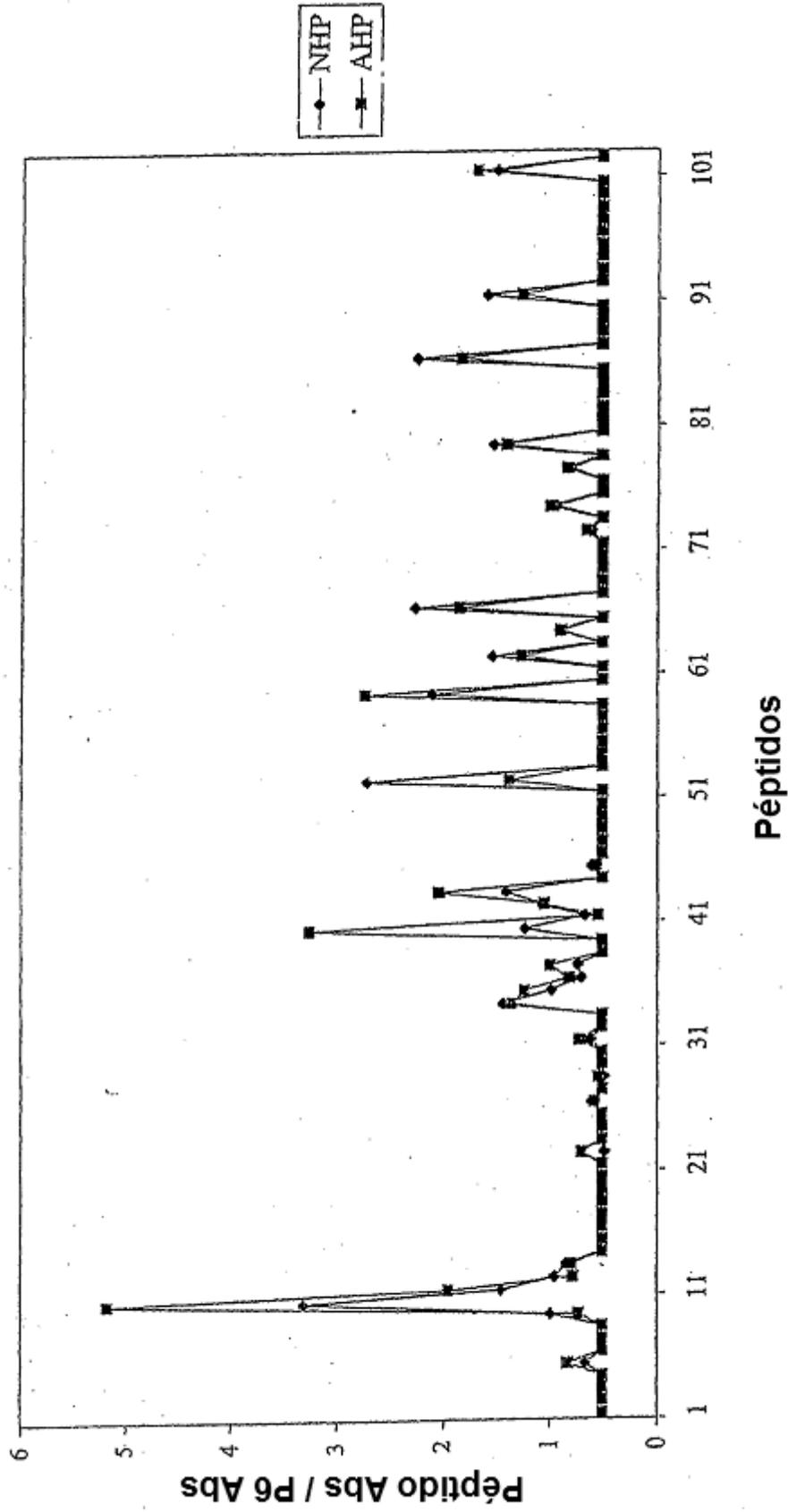


FIG. 3

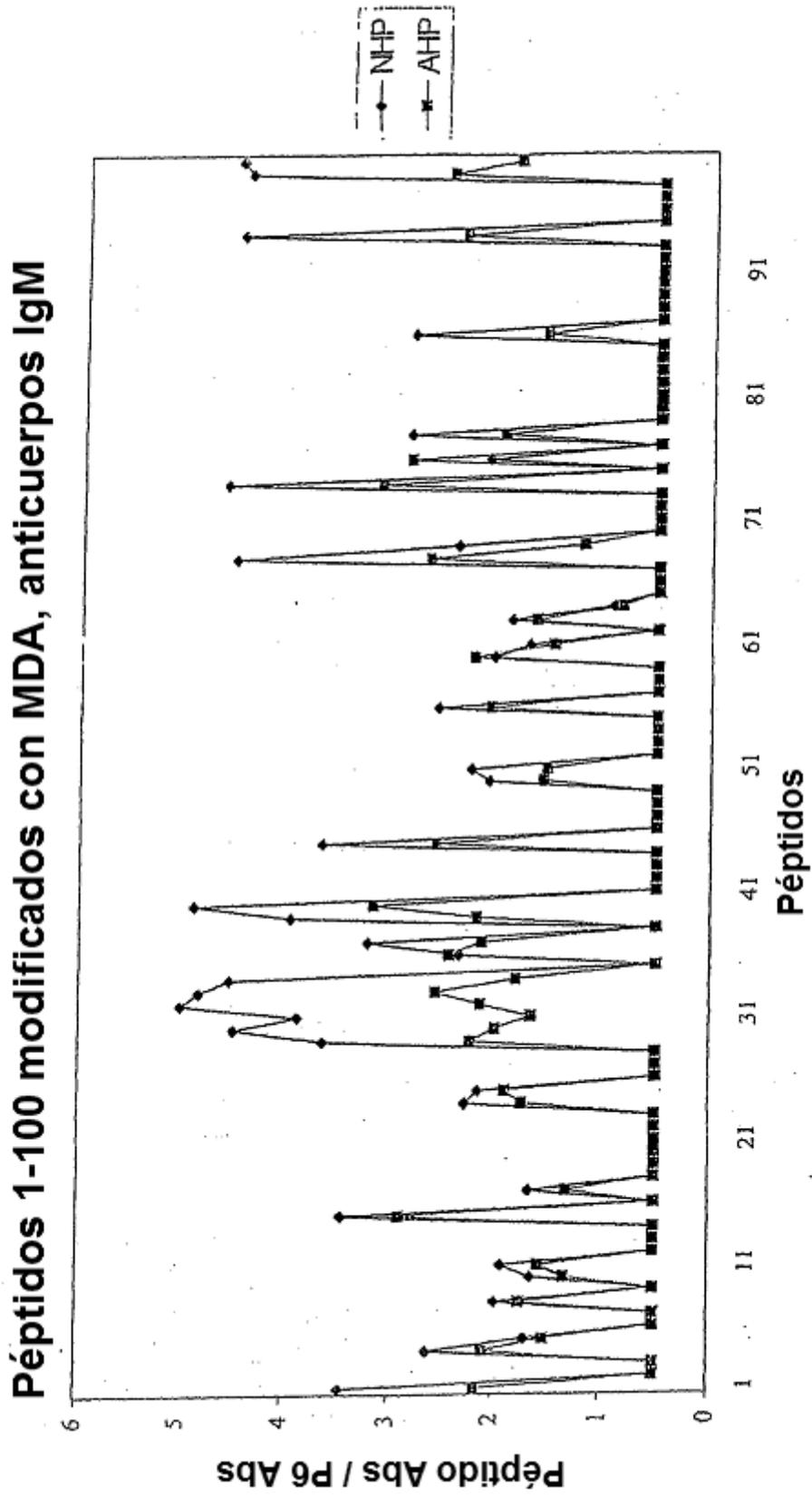


FIG. 4

Péptidos 101-200 modificados con MDA, anticuerpos IgM

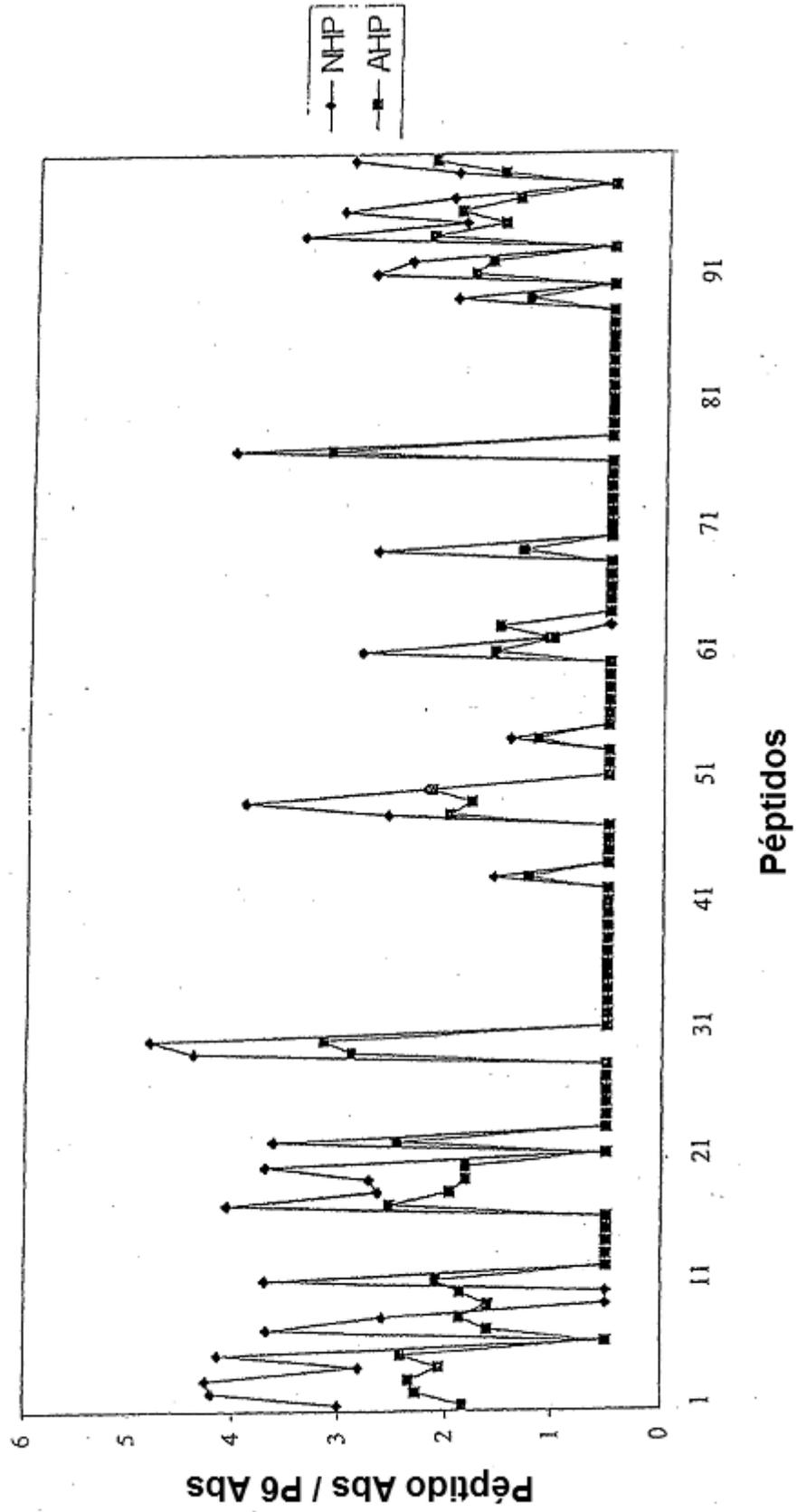


FIG. 5

Péptidos 201-302 modificados con MDA, anticuerpos IgM

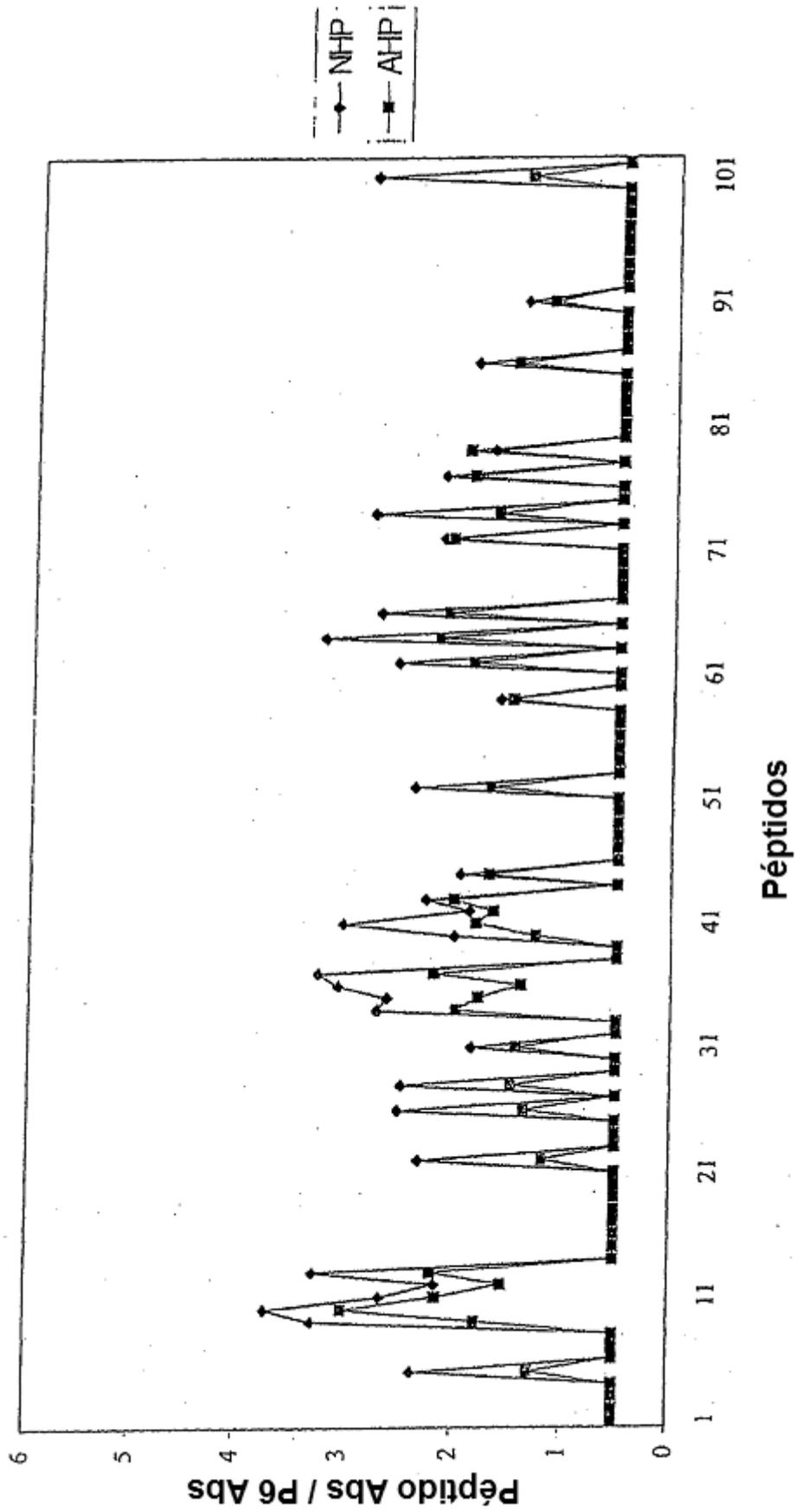


FIG. 6