



①9



CONFÉDÉRATION SUISSE
INSTITUT FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

①1 CH 694 460 A5

⑤1 Int. Cl.⁷: C 07 K 016/12
C 12 N 009/02

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

①2 FASCICULE DU BREVET A5

②1 Numéro de la demande: 01004/01

②2 Date de dépôt: 09.11.1999

③0 Priorité: 13.11.1998 US 60/108,309

②4 Brevet délivré le: 31.01.2005

④5 Fascicule du brevet
publié le: 31.01.2005

⑦3 Titulaire(s):
YUNG SHIN PHARMACEUTICAL IND. CO., LTD.
12F, 181, Section 3, Min-Chuan E. Road
Taipei (TW)

⑦2 Inventeur(s):
Fang-Jen, S. Lee
1F, No. 326, Section 2, Shih-Pai Road
Taipei (TW)
Chung-Hsiu, H. Wu
F5 Ln 305, Section 2, Cheng Kong Road
Neihu, Taipei (TW)

⑦4 Mandataire:
Luchs & Partner, Patentanwälte
Schulhausstrasse 12
8002 Zürich (CH)

⑧6 Demande internationale:
PCT/US 1999/026372 (En)

⑧7 Publication internationale:
WO 2000/029017 25.5.2000

⑤4 Anticorps se liant à la superoxyde-dismutase de *Mycobacterium tuberculosis*.

⑤7 L'invention concerne des anticorps se liant à la superoxyde-dismutase de *Mycobacterium tuberculosis*, et l'utilisation in vitro de ces anticorps dans un procédé de détection d'une infection chez un mammifère.



Description

Une superoxyde-dismutase catalyse la conversion de radicaux superoxydes (O_2^-) en oxygène moléculaire (O_2) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La conversion de radicaux superoxydes est généralement bénéfique pour une cellule, puisque de telles molécules peuvent réagir avec l'ADN génomique de la cellule pour induire des mutations.

Les superoxyde-dismutases (SOD) ont été classées sur la base des atomes inorganiques dont elles ont besoin pour leur activité. Trois familles de SOD ont été identifiées: celles qui ont besoin de manganèse (MnSOD), celles qui ont besoin de fer (FeSOD) et celles qui ont besoin de cuivre et de zinc (Cu, ZnSOD).

Les MnSOD ont été trouvées dans des mitochondries et des procaryotes, alors que les FeSOD ont été trouvées dans des procaryotes, des eucaryotes primitifs et certaines plantes. Les Cu, ZnSOD ont été trouvées à l'origine dans des eucaryotes et elles ont été trouvées plus tard dans plusieurs bactéries.

Les macrophages représentent une arme importante d'un système immunitaire de vertébrés. De telles cellules peuvent tuer des pathogènes tels que des bactéries en englobant le pathogène et en le bombardant avec des radicaux superoxydes. Par conséquent, une Cu, ZnSOD sécrétée peut jouer un rôle dans la survie de pathogènes bactériens, spécialement ceux qui sont connus pour survivre et croître dans des macrophages.

Résumé de l'invention

L'invention est basée sur la découverte d'une Cu, ZnSOD sécrétée dans une *Mycobacterium tuberculosis*. Il a été trouvé que des anticorps qui se lient spécifiquement à cette SOD de *M. tuberculosis* sont utiles dans la détection de la présence de la bactérie. Il a été également découvert que des patients tuberculeux développent des anticorps contre la Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis*. Ainsi, un patient produisant des anticorps contre une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* est diagnostique d'une tuberculose chez ce patient.

Par conséquent, l'invention représente un anticorps, tel qu'un anticorps monoclonal, qui se lie spécifiquement à un polypeptide constitué de la séquence d'acides aminés de la SEQ ID NO: 2, qui est la séquence d'acides aminés de la Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis*. Une liaison spécifique d'un anticorps au polypeptide veut dire qu'il ne se lie substantiellement pas à d'autres composants dans un échantillon. Une Cu, ZnSOD ou une superoxyde-dismutase de cuivre/zinc est un polypeptide qui facilite la conversion de radicaux superoxydes en oxygène moléculaire et en peroxyde d'hydrogène et dont l'activité de superoxyde-dismutase est dépendante de la présence d'atomes ou d'ions de cuivre et de zinc.

L'invention inclut également un procédé de détection d'une infection de *M. tuberculosis* chez un mammifère par (1) la fourniture d'un polypeptide comportant la séquence d'acides aminés de la SEQ ID NO:2; (2) la mise en contact du polypeptide avec un échantillon biologique (par exemple, un échantillon de sérum humain) recueilli à partir d'un mammifère, la mise en contact étant réalisée sous des conditions qui sont suffisantes pour permettre à un anticorps de se lier au polypeptide; et (3) la détermination de la présence d'un anticorps lié au polypeptide, dans lequel la présence de l'anticorps est une indication d'une infection due à une *M. tuberculosis* chez le mammifère. Ce procédé inclut éventuellement l'étape de retrait d'anticorps qui ne se lient pas au polypeptide.

L'invention représente également un procédé pour examiner si un composé inhibe l'activité de superoxyde-dismutase d'un polypeptide par (1) la mise en contact d'un polypeptide avec le composé, le polypeptide étant une Cu, ZnSOD (également appelée superoxyde-dismutase de cuivre/zinc) et comportant une séquence d'acides aminés qui est au moins 50% (par exemple, au moins 60, 70, 80, 90 ou 100%) identique à la SEQ ID NO:2; (2) la mesure du niveau de l'activité de superoxyde-dismutase; et (3) la comparaison du niveau de l'activité de superoxyde-dismutase en présence du composé avec le niveau de l'activité de superoxyde-dismutase en l'absence du composé. On dit que le composé inhibe l'activité de superoxyde-dismutase du polypeptide lorsque le niveau de l'activité de superoxyde-dismutase en présence du composé est plus bas que le niveau de l'activité de superoxyde-dismutase en l'absence du composé. Le polypeptide peut se trouver dans une cellule telle qu'une bactérie, par exemple, dans le périplasme de la bactérie.

Pour faciliter les procédés de détection ou d'examen de l'invention, le polypeptide peut être lié à un support solide (par exemple, un support de matière plastique telle qu'une plaque de microtitration). En outre, le polypeptide peut être lié de manière covalente à une bille de support solide telles qu'une Sepharose. La liaison covalente entre le polypeptide et un support peut être atteinte par des procédés bien connus de la technique. Par exemple, le polypeptide peut être lié de manière covalente à un support en le faisant réagir avec des formes chimiquement activées du support (par exemple, une Sepharose 4B activée par CNBr ou une Sepharose 4B EAH, disponible chez Pharmacia). En outre, des quantités égales du polypeptide peuvent être déposées dans chaque puits d'une plaque de microtitration, créant ainsi un réseau sur lequel des composés multiples peuvent être testés en parallèle ou des échantillons multiples peuvent être dosés pour la présence de *M. tuberculosis*.

Description détaillée

- 5 L'invention concerne un anticorps utile pour la détection de *M. tuberculosis* dans un échantillon, des procédés de détection d'une infection due à une *M. tuberculosis* chez un mammifère et des procédés pour examiner un composé sur sa capacité à inhiber une activité de SOD. Ces aspects de l'invention proviennent de la découverte d'une nouvelle Cu, ZnSOD produite par une *M. tuberculosis*.

I. Polypeptides

- 10 Les polypeptides de Cu, ZnSOD utiles dans les procédés de l'invention incluent le polypeptide de Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* décrit ci-dessous. Les Cu, ZnSOD utiles dans les procédés de l'invention ne sont limitées à la séquence d'origine naturelle. Une Cu, ZnSOD contenant des substitutions, des délétions ou des additions peut également être utilisée, sous réserve que ces polypeptides conservent au moins une activité associée au polypeptide d'origine naturelle et soient au moins 50% identiques à la séquence d'origine naturelle.

- 15 Pour déterminer le pourcentage d'identité de deux séquences de polypeptides, les séquences sont alignées dans le but d'une comparaison optimale (par exemple, des espaces peuvent être introduits dans la séquence d'une première séquence d'acides aminés pour un alignement optimal avec une deuxième séquence d'acides aminés). Les résidus d'acides aminés à des positions d'acides aminés correspondantes sont ensuite comparés. Lorsqu'une position dans la première séquence est occupée par le même résidu d'acides aminés que pour la position correspondante dans la deuxième séquence, alors les molécules sont identiques à cette position. Le pourcentage d'identité entre les deux séquences est une fonction du nombre de positions identiques partagées par les séquences (c'est-à-dire, % d'identité = # de positions identiques/# total de positions × 100).

- 25 La détermination du pourcentage d'homologie et d'identité entre deux séquences peut être accomplie en utilisant un algorithme mathématique. Un exemple d'un algorithme mathématique utilisé pour la comparaison de deux séquences est l'algorithme de Karlin et al., Proc Natl Acad Sci USA 87:2264-2268 (1990), modifié comme dans Karlin et al., Proc Natl Acad Sci USA 90:5873-5877 (1993). Un tel algorithme est incorporé dans les programmes NBLAST et XBLAST de Altschul et al., J Mol Biol 215:403-410 (1990). Des recherches de protéines blastiques peuvent être effectuées avec le programme XBLAST, score = 50, longueur de mot = 3 pour obtenir des séquences d'acides aminés homologues à des molécules de protéines utiles dans les procédés de l'invention. Pour obtenir des alignements avec des espaces à des fins de comparaison, le programme Gapped BLAST peut être utilisé comme il est décrit dans Altschul et al., Nucleic Acids Res 25:3389-3402 (1997). Lorsque l'on utilise les programmes BLAST et Gapped BLAST, les paramètres par défaut des programmes respectifs (par exemple, XBLAST et NBLAST) peuvent être utilisés. Voir <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Un autre exemple d'un algorithme mathématique utilisé pour la comparaison de séquences est l'algorithme de Myers et al., CABIOS (1989).

- 40 Un tel algorithme est incorporé dans le programme ALIGN (version 2.0) qui fait partie du progiciel d'alignement de séquences GCG. Lorsque l'on utilise le programme ALIGN pour comparer des séquences d'acides aminés, un tableau de poids de résidus PAM120, une pénalité de longueur d'espace de 12 et une pénalité d'espace de 4 peuvent être employés.

- 45 Le pourcentage d'identité entre deux séquences est déterminé en mettant en œuvre n'importe laquelle des techniques décrites ci-dessus avec des déductions pour les espaces. Dans un calcul de pourcentage d'identité, seules les correspondances exactes sont comptabilisées.

- 50 Un exemple d'une Cu, ZnSOD qui n'est pas d'origine naturelle, quoique utile dans les procédés de l'invention, est une protéine de fusion de Cu, ZnSOD-glutathione-S-transférase. Une telle protéine peut être produite dans de grandes quantités dans des bactéries et facilement isolée par l'intermédiaire d'une colonne d'affinité pour la glutathione. La protéine de fusion peut ensuite être utilisée dans un dosage de SOD in vitro en présence ou en l'absence d'un candidat inhibiteur de SOD (c'est-à-dire, un candidat agent anti-microbien contre la *M. tuberculosis*).

II. Anticorps

- 55 Le terme «anticorps», comme il est employé dans le présent document, se réfère à des molécules d'immunoglobuline et à des portions immunologiquement actives de molécules d'immunoglobuline, c'est-à-dire, des molécules qui contiennent un site de liaison d'antigène qui se lie spécifiquement à un antigène, tel qu'une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis*. Une molécule qui se lie spécifiquement à une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* est une molécule qui se lie à une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis*, mais qui ne se lie substantiellement pas à d'autres molécules dans un échantillon, par exemple, un échantillon biologique, qui contient naturellement une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis*. Des exemples de portions immunologiquement actives de molécules d'immunoglobuline incluent des fragments F(ab) et F(ab)₂ qui peuvent être générés en traitant l'anticorps avec une enzyme telle qu'une pepsine. L'invention fournit des anticorps polyclonaux et monoclonaux qui se lient à une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis*. Le terme 65 «anticorps monoclonal» ou «composition d'anticorps monoclonal», comme il est employé dans le pré-

sent document, se réfère à une population de molécules d'anticorps qui ne contiennent qu'une espèce d'un site de liaison d'antigène capable de réagir immunologiquement avec un épitope particulier d'une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis*. Ainsi, une composition d'anticorps monoclonal affiche typiquement une seule affinité de liaison pour la protéine de Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* avec laquelle elle réagit immunologiquement.

Des anticorps polyclonaux contre une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* peuvent être préparés en immunisant un sujet approprié avec un immunogène de Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis*. Le titre de l'anticorps anti-Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* dans le sujet immunisé peut être surveillé au cours du temps par des techniques standards, comme avec un dosage d'un immunoabsorbant lié à une enzyme (ELISA) en utilisant une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* immobilisée. Si on le désire, les molécules d'anticorps dirigées contre une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* peuvent être isolées à partir du mammifère (par exemple, à partir du sang) et purifiées davantage par des techniques bien connues, telles qu'une chromatographie de la protéine A pour obtenir la fraction IgG. A un temps approprié après l'immunisation, par exemple, lorsque les titres d'anticorps anti-Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* sont les plus élevés, des cellules produisant un anticorps peuvent être obtenues à partir du sujet et utilisées pour préparer des anticorps monoclonaux par des techniques standards, telles que celles qui sont décrites dans Kohler et al., *Nature* 256:495-497, 1975; Kozbor et al., *Immunol Today* 4:72, 1983; et Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985. La technologie pour produire divers hybridomes d'anticorps monoclonaux est bien connue (voir, par exemple, Coligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1994). Brièvement, une lignée de cellules immortelles (typiquement, un myélome) est fusionnée à des lymphocytes, (typiquement, des splénocytes) provenant d'un mammifère immunisé avec un immunogène de Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* comme il est décrit ci-dessus et le surnageant des cultures des cellules d'hybridomes résultantes est passé au crible pour identifier un hybridome produisant un anticorps monoclonal qui se lie à une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis*.

N'importe lequel des nombreux protocoles bien connus mis en œuvre pour fusionner des lymphocytes et des lignées de cellules immortalisées peut être appliqué dans le but de générer un anticorps contre une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* (voir, par exemple, *Current Protocols in Immunology*, supra; Galfre et al., *Nature* 266:55052, 1977; Kenneth, *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York, 1980; et Lerner *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402, 1981). De plus, un spécialiste ordinaire se rendra compte qu'il existe de nombreuses variations de ces procédés qui devraient également être utiles. Typiquement, la lignée de cellules immortelles (par exemple, une lignée de cellules de myélome) est dérivée de la même espèce mammifère que les lymphocytes. Par exemple, des hybridomes murins peuvent être fabriqués en fusionnant des lymphocytes provenant d'une souris immunisée avec une préparation immunogénique de la présente invention avec une lignée de cellules immortalisées de souris, par exemple, une lignée de cellule de myélome qui est sensible à un milieu de culture contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine («milieu HAT»). Un nombre quelconque de lignées de cellules de myélome peut être utilisé en tant que partenaire de fusion suivant des techniques standards, par exemple, les lignées de myélome P3NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 ou Sp2/0-Ag14. Ces lignées de myélome sont disponibles à partir de l'ATCC. Typiquement, des cellules de myélome de souris sensibles à HAT sont fusionnées à des splénocytes de souris en employant du polyéthylène glycol («PEG»). Les cellules hybridomes résultant de la fusion sont ensuite sélectionnées en utilisant un milieu HAT, qui tue les cellules de myélome non fusionnées et fusionnées de manière non productive (des splénocytes non fusionnés meurent après plusieurs jours, car ils ne sont pas transformés). Les cellules hybridomes produisant un anticorps monoclonal de l'invention sont détectées par un passage au crible du surnageant des cultures hybridomes pour des anticorps qui se lient à une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis*, par exemple, en mettant en œuvre un dosage ELISA standard.

Selon une variante de préparation d'hybridomes sécrétant un anticorps monoclonal, un anticorps monoclonal contre une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* peut être identifié et isolé par un passage au crible d'une bibliothèque combinatoire d'immunoglobulines de recombinaison (par exemple, une bibliothèque d'expression dans des phages d'anticorps) avec une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* pour isoler de cette manière des éléments de la bibliothèque d'immunoglobulines qui se lient à une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis*. Des kits permettant de générer et de passer au crible des bibliothèques d'expression dans des phages sont disponibles dans le commerce (par exemple, the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catalogue No. 27-9400-01; et le kit d'expression dans des phages Stratagene SurfZAP™, Catalogue No. 240612). En outre, des exemples de procédés et de réactifs pouvant particulièrement faire l'objet d'une utilisation dans la génération et le passage au crible d'une bibliothèque d'expression d'anticorps peuvent être trouvés dans, par exemple, le brevet U.S. No. 5 223 409; les publications PCT Nos. WO 92/18 619, WO 91/17 271, WO 92/20 791, WO 92/15 679, WO 93/01 288, WO 92/01 047, WO 92/0 990, WO 90/02 809; Fuchs et al., *Bio/Technology* 9:1370-1372, 1991; Hay et al., *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85, 1992; Huse et al., *Science* 246:1275-1281, 1989; et Griffiths et al., *EMBO J* 12:725-734, 1993.

De plus, des anticorps de recombinaison contre une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis*, tels que des anticorps monoclonaux chimériques et humanisés, comprenant des portions à la fois humaines et non hu-

maines, qui peuvent être fabriqués en utilisant des techniques standards de l'ADN recombinant, se trouvent dans la portée de l'invention. De tels anticorps monoclonaux chimériques et humanisés peuvent être produits par des techniques de l'ADN recombinant connues de la technique, par exemple en mettant en œuvre des procédés décrits dans les Publications PCT Nos. WO 87/02 671 et WO 86/01 533; les demandes de brevets européens Nos. 184 187, 171 496, 173 494 et 125 023; les brevets U.S. Nos. 4 816 567 et 5 225 539; Better et al., *Science* 240:1041-1043, 1988; Liu et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3439-3443, 1987; Liu et al., *J Immunol* 139:3521-3526, 1987; Sun et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 84:214-218, 1987; Nishimura et al., *Cane Res* 47:999-1005, 1987; Wood et al., *Nature* 314:446-449, 1985; Shaw et al., *J Natl Cancer Inst* 80:1553-1555, 1988; Morrison, *Science* 229:1202-1207, 1985; Oi et al., *Bio/Techniques* 4:214, 1986; Jones et al., *Nature* 321:552-555, 1986; Verhoeyan et al., *Science* 239:1534, 1988; et Beidler et al., *J Immunol* 141:4053-4060, 1988.

Un anticorps contre une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* (par exemple, un anticorps monoclonal) peut être utilisé pour isoler une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* par des techniques standards, telles qu'une chromatographie d'affinité ou une immunoprécipitation. Un anticorps contre une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* peut faciliter la purification d'une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* naturelle provenant de bactéries et d'une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* produite par recombinaison et exprimée dans des cellules hôtes. De plus, un anticorps anti-Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* peut être utilisé pour détecter une protéine de Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* (par exemple, dans un lysat cellulaire ou un échantillon de sérum) dans le but d'évaluer l'abondance de la protéine de Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis*. La détection peut être facilitée en couplant l'anticorps à une substance détectable. Des exemples de substances détectables incluent diverses enzymes, divers groupements prosthétiques, diverses matières fluorescentes, diverses matières luminescentes, diverses matières bioluminescentes et diverses matières radioactives. Des exemples d'enzymes appropriées incluent une raifort-peroxydase, une phosphatase alcaline, une β -galactosidase ou une acétylcholinestérase. Des exemples de complexes de groupements prosthétiques appropriés incluent la streptavidine/biotine et l'avidine/biotine. Des exemples de matières fluorescentes appropriées incluent l'umbelliféronne, la fluoescéine, l'isothiocyanate de fluoescéine, la rhodamine, la dichlorotriazinylamine de fluoescéine, le chlorure de dansyle ou la phycoérythrine. Un exemple d'une matière luminescente inclut le luminol. Des exemples de matières bioluminescentes incluent la luciférase, la luciférine et l'aequorine. Des exemples de matières radioactives appropriées incluent ^{125}I , ^{132}I , ^{35}S ou ^3H .

III Mise en contact d'un composé avec une Cu, ZnSOD

Pour des dosages *in vitro*, une mise en contact du composé avec la Cu, ZnSOD peut se produire en mélangeant la Cu, ZnSOD avec le composé dans une solution, une suspension ou un gel. Cette solution, cette suspension ou ce gel est ensuite soumis à un dosage de SOD.

Pour des dosages cellulaires, n'importe quel polypeptide de Cu, ZnSOD peut être exprimé dans une cellule, si la cellule n'exprime pas déjà Cu, ZnSOD, ou surexprimé dans la cellule, si la cellule exprime déjà Cu, ZnSOD. Des procédés d'expression de protéines dans une cellule sont bien connus de la technique.

Si la Cu, ZnSOD demeure dans une cellule, le composé peut être délivré dans la cellule par des procédés bien connus de la technique. Si le composé est une molécule perméable à une membrane, alors le composé peut être directement mélangé avec la cellule, permettant un contact entre la Cu, ZnSOD et le composé. Si le composé n'est pas perméable à une membrane, comme il est attendu pour de nombreuses macromolécules, le composé peut être délivré dans la cellule par électroporation, ou si c'est un polypeptide, un acide nucléique ou un vecteur viral.

En outre, la cellule peut être une cellule animale *in vivo*. La délivrance d'un composé vers la cellule peut être accomplie par n'importe quelle voie connue de la technique, y compris une injection intraveineuse. Selon une variante, un composé de polypeptide peut être administré par un acide nucléique ou un vecteur viral, si une délivrance dans la cellule est désirée.

IV Dosages de la superoxyde-dismutase

Des dosages pour l'activité de superoxyde-dismutase peuvent être déterminés par n'importe quelle technique standard connue de la technique. Voir, par exemple les dosages décrits dans Beauchamp et al., *Anal Biochem* 44:27 6-287, 1971; et des références dans ce document.

Un grand nombre de ces dosages dépend d'une photoréduction de nitro blue tétrazolium (NBT), un procédé induit par la production de radicaux superoxydes. L'activité de superoxyde-dismutase est reflétée dans n'importe quelle inhibition de la réduction de NBT. Une exposition à une source de lumière appropriée transformera le NBT en un colorant bleu facilement quantifiable par son absorbance à 560 nm. Cependant, en présence d'une superoxyde-dismutase, la photoréduction du NBT en un colorant bleu sera diminuée ou éliminée. Des procédures spécifiques basées sur ce concept général sont bien connues de la technique. Voir, par exemple, la procédure décrite ci-dessous.

Sans étude détaillée supplémentaire, on croit qu'un spécialiste de la technique peut, sur la base de l'exposé ci-dessus et de la description ci-dessous, utiliser la présente invention dans son étendue la

plus large. Les exemples suivants sont à interpréter comme simplement illustratifs de la manière dont un spécialiste de la technique peut mettre en pratique l'invention et ne sont en aucun cas limitatifs du reste de l'exposé. Toutes les publications citées dans cet exposé sont par ce moyen introduites en référence.

5

Exemple 1: Clonage et caractérisation de la Cu, ZnSOD de Mycobacterium tuberculosis

Des souches XL1 blue (Stratagen) et BL21(DE3) (Novagen) de E. coli ont été utilisées pour le clonage et la surexpression de protéines de recombinaison, respectivement. Une H37Rv de M. tuberculosis a été employée pour une analyse par microscopie électronique.

Des procédures de clonage ont été réalisées suivant des protocoles standards. Des fragments du gène sodC ont été amplifiés par PCR à partir de l'ADN génomique d'une M. tuberculosis en utilisant les paires d'oligonucléotides 5'-CATATGTCTACAGTTCCGGGTACCA-3' (SEQ ID NO:3) et 5'-GGATCCAA-GCTAGCCGGAACCAATGA-3' (SEQ ID NO:4) pour le clone à longueur entière, et 5'-CATATGCCAAA-GCCCCCGGATCA-3' (SEQ ID NO: 5) et 5'-GGATCCAAAGCTAGCCGGAACCAATGA-3' (SEQ ID NO:6), pour une forme tronquée (décrite ci-dessous). Les produits PCR ont été clonés dans le vecteur T pT7-Blue (Novagene) et ensuite sous-clonés dans les sites NdeI et BamHI du vecteur d'expression pET15B (Novagene). Les deux brins des fragments clonés ont été séquencés en utilisant la chimie de séquençage par fluorescence de ABI BigDye (PE Applied Biosystems) suivant les instructions du fabricant et un séquenceur automatique ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems).

20

Le séquençage a révélé que le gène sodC contenait le cadre de lecture ouvert suivant:

25 ATGCCAAAGCCCGCCGATCACCGCAATCACGCAGCTGTCAGC
ACGTCGGTCCCTGTCCGCGTTGTTTCTGGGCGCCGGTGCCGCG
CTGCTGAGCGCATGCTCGTCGCCGCAGCACGCGTCTACAGTT
30 CCGGGTACCACGCCGTGATTTGGACCGGATCGCCCGCGCCG
TCGGGACTTTCGGGTCACGACGAGGAGTCGCCCCGGTGCGCAG
35 AGCCTGACCAGTACCCTGACGGCGCCCGACGGCACGAAGGTA
GCGACCGCGAAGTTTCGAGTTCGCCAACGGCTATGCCACCGTC
40 ACGATCGCGACGACCGGCGTCGGTAAGCTCACGCCCGGCTTC
CACGGCCTACACATCCACCAGGTGGGTAAGTGTGAGCCCAAC
TCGGTTGCCCCCACC GGCGGTGCGCCCGGCAACTTTCTGTCC
45 GCCGGCGGCCACTACCACGTGCCAGGGCATAACGGCACCCCC
GCCAGCGGCGACCTGGCCTCGCTGCAGGTACGCGGTGACGGT
50 TCGGCGATGCTGGTGACCACCACCGACGCCTTCACCATGGAC
GACCTGCTGAGCGGCGCGAAAACCGCGATCATTCACGCC
GGCGCCGACAACCTTTGCCAACATTCCGCCAGAACGCTACGTC
55 CAGGTCAATGGGACTCCGGGTCCCGACGAGACGACGTTGACC
ACCGGCGACGCCGGCAAGCGGGTGGCGTGCGGTGTCATTGGT
60 TCCGGC (SEQ ID NO:1).

65

Le cadre de lecture ouvert est terminé par un codon d'arrêt TAG naturel suivant immédiatement la séquence ci-dessus. Ce cadre de lecture ouvert codait pour un polypeptide de 240 acides aminés présentant la séquence suivante:

5 MPKPADHRNHAAVSTSVLSALFLGAGAALLSACSSPQHASTV
 PGTTPSIWTGSPAPSGLSGHDEESPGAQSLTSTLTAPDGTKV
 ATAKFEFANGYATVTIATTGVGKLTPGFHGLHIHQVGKCEPN
 10 SVAPTGGAPGNFLSAGGHYHVPGHGTGPASGDLASLQVRGDG
 SAMLVTTTDAFTMDDLSSAKTAIIHAGADNFANIPPERYV
 15 QVNGTPGPDETTLTG DAGKRVACGVIGSG (SEQ ID NO:2)

En utilisant l'analyse du programme PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>), un peptide de signal hypothétique (souligné ci-dessus) a été trouvé à la partie N-terminale de ce polypeptide.

Les vecteurs d'expression pET15b codant pour des versions de la SOD ci-dessus ont été utilisés pour transformer des cellules BL21(DE3). Le plasmide L-sodC inclut la SEQ ID NO:1. Le plasmide S-sodC inclut les nucléotides 118-720 de la SEQ ID NO: 1, à l'exception de la séquence codant pour le peptide signal. Le M-sodC inclut les nucléotides 118-720, avec une mutation de T à A dans le codon d'arrêt naturel, de sorte qu'une Lys est codée. Une séquence supplémentaire en aval du codon codant pour la nouvelle Lys a été ensuite ajoutée, (CCGAATTGCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATC-CGGCTGCTAA; SEQ ID NO:7), codant ainsi pour la séquence d'acides aminés supplémentaire PNSSTLAAVTSGSGC (SEQ ID NO:8). Les expressions des protéines de recombinaison ont été induites en incubant la bactérie BL21(DE3) portant le plasmide sodC de recombinaison dans un bouillon LB contenant 0,5 mM de IPTG à 37°C pendant 100 minutes. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation et lysées par ultra-sons dans un tampon de 10 mM phosphate (pH 7,4) et 10 mM d'imidazole. Les protéines de recombinaison dans les corps d'inclusion ont été dénaturées et solubilisées dans 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM de NaCl, 8 M d'urée et 50 mM d'imidazole. Les protéines ont été ensuite purifiées sur une colonne His-Trap-Chelating (Pharmacia) suivant les instructions du fabricant. Les protéines de recombinaison purifiées ont été renaturées par une dialyse contre 50 mM de Tris-HCl pH 7,8, 1 mM de CuSO_4 et 1 mM de ZnSO_4 à 4°C, avec plusieurs changements de dialysats. Les protéines purifiées ont été stockées dans un dialysat complété avec 20% de glycérol. Les protéines de recombinaison qui étaient solubles dans les extraits sans cellules ont été purifiées en utilisant la même colonne sous des conditions naturelles (c'est-à-dire, avec un dialysat sans CuSO_4).

La majorité des protéines surexprimées étaient présentes dans les corps d'inclusion insoluble à la suite d'une induction IPTG. Ces protéines dans les corps d'inclusion ont été dénaturées, solubilisées avec de l'urée et purifiées jusqu'à un état proche de l'homogénéité, comme il est indiqué sur un gel SDS-PAGE coloré avec le bleu brillant Coomassie R-250. Une fraction mineure de ces protéines a été également purifiée sous une forme soluble à partir des lysats cellulaires. Le gel SDS-PAGE a également révélé que L-sodC présentait un MW d'environ 28–32 kDa, que M-sodC présentait un MW d'environ 26 kDa et que S-sodC présentait un MW d'environ 24–25 kDa.

La protéine M-sodC a été préparée pour une production d'anticorps en fractionnant la protéine M-sodC purifiée par affinité sur un gel SDS-PAGE coloré avec le bleu brillant Coomassie R-250. Une tranche de gel contenant la protéine M-sodC a été mélangée avec un adjuvant de Freund complet et le mélange a été utilisé pour immuniser des lapins blancs de Nouvelle-Zélande âgés de 3 mois. L'immunisation initiale a été suivie par trois accélérateurs avec une protéine mélangée avec un adjuvant de Freund incomplet. Des antisérums ont été recueillis par intervalles de 10 jours débutant à partir de la dernière accélération.

Les échantillons de protéines devant être analysés ont été fractionnés sur un gel SDS-PAGE, électrotransférés vers une membrane Immobilon TMP (Millipore) et soumis à une détection avec un antisérum de lapin suivi par une raifort-peroxydase conjuguée à un anticorps IgG anti-lapin d'âne (Amersham). Des bandes cibles ont été détectées avec le kit de chimiluminescence améliorée (ECL, Amersham) et enregistrées sur un film Hyperfilm-MP (Amersham).

Des antisérums polyclonaux de lapin contre la protéine de recombinaison M-sodC purifiée ont reconnu toutes les trois formes des protéines SOD et n'ont pas eu une réaction croisée avec le produit de gène sodC de *E. coli*. De manière plus significative, les antisérums ont reconnu une seule polypeptide d'environ 26 kDa en taille dans des lysats de *M. tuberculosis* prouvant que la séquence sodC exprime une protéine. Cette découverte suggère également que la SOD de *M. tuberculosis* a été traitée sous une forme mature, comme il a été prédit ci-dessus, et sécrétée.

Pour évaluer l'activité enzymatique de SOD des protéines de recombinaison, des bactéries exprimant les protéines ont été remises en suspension dans 50 mM de tampon de phosphate (pH 7,8) et 0,1 mM d'EDTA, passées aux ultrasons et centrifugées pour obtenir des extraits bactériens. L'activité SOD a été

dosée par une séparation des extraits sur un gel de 10% de polyacrylamide non dénaturant, une coloration avec NBT et une exposition à une lumière comme il est décrit dans Beauchamp, supra. Le KCN 1 mM était connu pour inhiber sélectivement l'activité de Cu, ZnSOD et il a donc été ajouté pour contrôler les échantillons afin de confirmer que l'activité de SOD était due à une enzyme Cu, ZnSOD.

5 La majorité de la Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* exprimée dans *E. coli* a été trouvée dans les corps d'inclusion insolubles et ne possédait aucune activité enzymatique. Pour reconstituer l'activité enzymatique, des protéines de recombinaison purifiées préparées à partir des corps d'inclusion ont été dénaturées avec de l'urée et renaturées par une dialyse dans une solution de Cu^{2+} et Zn^{2+} . La protéine de recombinaison M-sodC renaturée purifiée à partir des corps d'inclusion a formé de multiples bandes blanches sur le gel coloré en bleu NBT. Ces bandes peuvent représenter des conformations multiples de la protéine de recombinaison active.

10 Une Cu, ZnSOD de recombinaison (S-sodC) purifiée à partir de la fraction cytoplasmique soluble était représentée par une seule bande blanche sur le gel coloré en bleu NBT. Les bandes blanches représentant une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* (S-sodC), une Cu, ZnSOD de levure et des formes renaturées de Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* (M-sodC) étaient toutes supprimées lorsque le gel était coloré en présence de 1 mM de KCN. Ce résultat a démontré que la protéine codée par le gène sodC de *M. tuberculosis* codait pour une superoxyde-dismutase à cofacteurs Cu, Zn authentique.

Pour déterminer le cloisonnement cellulaire de la Cu, ZnSOD, l'enzyme L-sodC a été exprimée dans une *E. coli* et les bactéries ont été soumises à une microscopie électronique à immunomarquage à l'or comme suit. Une préparation d'un complexe or-IgG colloïdal de 15 nm et un immunomarquage à l'or ont été effectués comme il est décrit dans Lin et al., J Ultrastruct Res 84:16-23, 1983; et Chang et al., J Gen Virol 78:1175-1179, 1997. Brièvement, plusieurs colonies de *M. tuberculosis* ont été raclées à partir d'une gélose inclinée et fixées dans 1% de formaldéhyde et 0,1 M de tampon de phosphate-citrate (pH 7,2) à 4°C pendant une nuit. Les échantillons fixés ont été neutralisés avec 0,1 M de chlorure d'ammonium et 0,1 M de tampon de phosphate-citrate (pH 7,2) à 0°C pendant 30 min. Cette neutralisation a été suivie par une déshydratation à travers une série de lavages au méthanol, tout d'abord avec 50% de méthanol à 0°C pendant 15 minutes, puis répété avec 75% et 90% de méthanol et ensuite deux lavages avec 100% de méthanol à -20°C pendant 1 heure pour chaque lavage. Les échantillons déshydratés ont été infiltrés avec une série calibrée d'agent d'enrobage LR Gold (or). Les échantillons ont été tout d'abord infiltrés par immersion dans 25% de LR Gold, 10% de PVP-6.000 à -20°C pendant 1 heure. Puis, les échantillons ont été immergés dans 50% de LR Gold, 10% de PVP-6.000 à -20°C pendant 2 heures, opération suivie par 75% de LR Gold à -20°C pendant 4 heures. Enfin, les échantillons ont été totalement infiltrés avec 100% de LR Gold à -20°C pendant une nuit. La polymérisation de l'agent d'enrobage a été initiée avec une irradiation UV sur grande longueur d'onde à -20°C pendant 24 heures et les échantillons ont été durcis à la température ambiante pendant 24 heures. Des sections ultra-minces (100 nm) des échantillons enrobés de LR Gold ont été montées sur des grilles de nickel de 200 mailles couvertes avec un film de collodion avec un recto de carbone. Les sections sur les grilles ont été bloquées avec 3% de sérum de chèvre normal dans PBS pendant 10 minutes, incubées avec l'antisérum de lapin contre Cu, ZnSOD (voir ci-dessus) pendant 15 minutes, lavées avec 1% de sérum de chèvre normal dans PBS et incubées avec le complexe or-IgG colloïdal pendant 10 min. Les grilles ont été grandement lavées avec trois verres d'eau distillée avant de les faire contraster avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb. Les sections ont été examinées avec un microscope électronique Zeiss EM109 (Zeiss, Allemagne).

45 Etant donné que l'espace périplasmique n'est pas présent dans la bactérie grain-positive *M. tuberculosis*, la sécrétion de la Cu, ZnSOD à la périphérie de la bactérie a été examinée. En utilisant un immunomarquage à l'or et une microscopie électronique, il a été montré que la Cu, ZnSOD était localisée de façon prédominante à la périphérie de la *M. tuberculosis*. Ce résultat est cohérent avec les découvertes décrites ci-dessus, à savoir que (1) la Cu, ZnSOD possédait une séquence de peptide de signal hypothétique et (2) la Cu, ZnSOD mature, d'origine naturelle affichait une taille similaire à celle de la protéine S-sodC tronquée sur des gels SDS-PAGE. Ces données suggèrent que la Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* est soit sécrétée, soit fixée à la surface externe de la bactérie.

Dans une expérience séparée, la Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* a été exprimée dans une *E. coli*. La localisation de la protéine exprimée a été ensuite déterminée en utilisant un microscope électronique à immunomarquage à l'or comme il est décrit ci-dessus. Une coloration indiquait que la Cu, ZnSOD était localisée de façon prédominante dans l'espace périplasmique des bactéries. Ainsi, cette protéine peut être produite par recombinaison et sécrétée dans des cellules appropriées pour une production à grande échelle de la protéine.

60 Exemple 2: Dosage d'un immunoadsorbant lié à une enzyme pour détecter une Mycobacterium tuberculosis

Etant donné qu'une Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* est exposée à l'extérieur de la cellule, un dosage de détection ELISA a été développé en utilisant des anticorps spécifiques pour la Cu, ZnSOD. Les puits ont été recouverts avec 1,22, 4,88, 19,5, 78,1, 312 ou 1250 ng/ml de solutions de S-sodC par une incubation à 4°C pendant une nuit. La protéine a été ensuite retirée et les puits ont été bloqués avec

10% de sérum embryonnaire de veau dans PBST à 37°C pendant deux heures. Les puits ont été lavés 3 x avec PBST et une dilution de 1:400 de l'antisérum de lapin obtenu dans l'Exemple 1 ci-dessus a été ajoutée. Les anticorps de lapin ont été incubés dans les puits à 4°C pendant une nuit. Ensuite, les puits ont été lavés 3 x avec PBST et une dilution de 1:1000 d'un anticorps anti-lapin d'âne conjugué à une raifort-peroxydase (Amersham, Cat. No. NA943) a été ajoutée. L'anticorps d'âne a été incubé dans les puits à 37°C pendant six heures. Les puits ont été de nouveau lavés 3 x avec PBST et une couleur a été développée en ajoutant TMB (KPL, Inc.) et par une incubation à la température ambiante pendant moins de 30 minutes. Les réactions ont été stoppées en ajoutant 1 M de H₃PO₄.

Les lectures d'absorbance à 450 nm indiquaient un domaine de détection dynamique ou quantifiable entre environ 10 ng et 1000 ng. Pour des échantillons contenant plus de 1000 ng, les lectures n'étaient plus dynamiques. Ce résultat indiquait qu'un procédé de détection ELISA utile pour une *M. tuberculosis* pouvait être développé en employant des anticorps spécifiques pour la Cu, ZnSOD décrite ci-dessus.

Exemple 3: Détection d'une infection due à une *Mycobacterium tuberculosis*

Etant donné que la Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* a été exposée à l'environnement extracellulaire, la capacité de patients tuberculeux (TB) à générer des anticorps contre la Cu, ZnSOD a été examinée. Des sérums de patients TB ont été utilisés pour détecter la Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis* décrite ci-dessus dans des Western blots. Les résultats indiquaient que 12 sur 110 patients ont produit des anticorps contre la Cu, ZnSOD de *M. tuberculosis*, indiquant que la présence d'anticorps contre cette protéine chez un individu peut être utilisée comme marqueur de substitution pour une TB.

Autres réalisations

Il doit être compris que, tandis que l'invention a été décrite conjointement à la description détaillée de celle-ci, la description précédente est destinée à illustrer et non à limiter la portée de l'invention, qui est définie par la portée des revendications jointes. D'autres aspects, avantages et modifications se trouvent dans la portée de cette invention.

Revendications

1. Anticorps qui se lie spécifiquement a un polypeptide constitué d'une séquence d'acides aminés de la SEQ ID NO:2.
2. Anticorps suivant la revendication 1, dans lequel l'anticorps est un anticorps monoclonal.
3. Utilisation in vitro de l'anticorps selon la revendication 1 dans un procédé de détection chez un mammifère d'une infection due a une *Mycobacterium tuberculosis*, ce procédé comprenant: la fourniture d'un polypeptide comportant la séquence d'acides aminés de la SEQ ID NO:2; la mise en contact du polypeptide avec un échantillon biologique recueilli a partir d'un mammifère, la mise en contact étant réalisée sous des conditions qui sont suffisantes pour permettre a un anticorps de se lier au polypeptide; et la détermination de la présence d'un anticorps lié au polypeptide, dans lequel la présence de l'anticorps est une indication d'une infection due a une *Mycobacterium tuberculosis* chez le mammifère.
4. Utilisation suivant la revendication 3, comprenant en outre le retrait d'anticorps qui ne se lient pas au polypeptide.
5. Utilisation suivant la revendication 3, dans lequel le polypeptide est lie a un support solide.
6. Utilisation suivant la revendication 5, dans lequel le support solide est une matière plastique.
7. Utilisation suivant la revendication 5, dans lequel le polypeptide est lie de façon covalente au support solide.
8. Utilisation suivant la revendication 3, dans lequel le mammifère est un être humain et l'échantillon biologique est un échantillon de sérum humain.