

# 公告本

本案已向

國(地區)申請專利

美國 US

申請日期

1998/11/13 60/108,309

案號

主張優先權

有

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼

無



## 五、發明說明 (1)

### 發明背景

超氧化物歧化酶催化超氧化物自由基 ( $O_2^-$ ) 成為氧分子 ( $O_2$ ) 及過氧化氫 ( $H_2O_2$ ) 的轉變。因為這樣的分子會與細胞的基因體作用而誘導突變，所以超氧化物自由基的轉變通常對細胞而言是有利的。

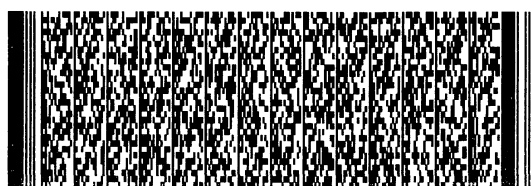
超氧化物歧化酶 (SOD) 基於它們對於活性所需要的無機原子而分類。已定義了三個SOD族群：需要錳的超氧化物歧化酶 (MnSOD)、需要鐵的超氧化物歧化酶 (FeSOD) 以及需要銅和鋅的超氧化物歧化酶 (Cu, ZnSOD)。

MnSODs 已發現存在於粒腺體及原核生物中，而FeSODs 已發現存在於原核生物、遠古真核生物以及一些植物之中。Cu, ZnSODs 起初發現於真核生物，後來在數種細菌之中發現。

巨噬細胞是脊椎動物免疫系統的重要力量。這樣的細胞可藉由吞入病菌並以超氧化物自由基攻擊而殺死病原（例如細菌）。因此，分泌的Cu, ZnSOD可能扮演細菌性病原生存的角色，特別是在巨噬細胞中生存及生長的病原。

### 發明概述

本發明是以在結核桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 發現分泌的Cu, ZnSOD為基礎。已發現專一性地與這個結核桿菌SOD結合的抗體，是有效用於偵測此細菌之存在。也發現結核病患發展出對抗結核桿菌Cu, ZnSOD的抗體。因此，病患所製造之對抗結核桿菌Cu, ZnSOD的抗體，是



## 五、發明說明 (2)

在該病患中對於結核病的診斷特徵。

因此，本發明以一種抗體為特徵，例如，一種可專一性地結合至由序列辨識編號2的胺基酸序列所組成之多胜肽的單株抗體，而序列辨識編號2是結核桿菌Cu, ZnSOD的胺基酸序列。抗體專一性地結合至多胜肽是指它本質上不會結合至樣本內的其他成份。Cu, ZnSOD或銅/鋅超氧化物歧化酶，是加速超氧化物自由基轉變至氧分子及過氧化氫的多胜肽，並且其超氧化物歧化酶的活性是取決於銅及鋅原子或離子的存在。

本發明也包括一種偵測哺乳動物感染結核桿菌的方法，包括(1)提供一段包括序列辨識編號2之胺基酸序列的多胜肽；(2)在足以使抗體結合至此多胜肽的條件下，使此多胜肽與收集自哺乳動物的生物性樣本接觸(例如，人類血清樣本)；以及(3)測定結合至此多胜肽之抗體的存在，其中此抗體的存在表示哺乳動物感染結核桿菌。這個方法可視需要地包括移除不與此多胜肽結合的抗體。

本發明也以測試一化合物是否會抑制多胜肽之超氧化物歧化酶活性的方法為特徵，包括(1)將此化合物與一多胜肽接觸，此多胜肽是Cu, ZnSOD(也稱為銅/鋅超氧化物歧化酶)並具有與序列辨識編號2至少50%相同度(例如，至少60、70、80、90或100%)的胺基酸序列；(2)測量超氧化物歧化酶活性的程度；以及(3)比較此化合物存時與不存在時之超氧化物歧化酶活性的程度。當此化合物存在時



### 五、發明說明 (3)

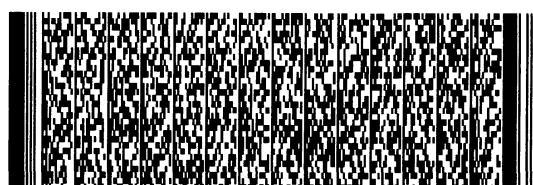
的超氧化物歧化酶活性之程度是比此化合物不存在時的超氧化物歧化酶活性之程度還要低的時候，此化合物稱為具有可抑制多胜肽的超氧化物歧化酶活性。此多胜肽可以在細胞（例如細菌）內，例如，在細菌的胞漿周圍（periplasm）內。

為了加速本方法的偵測或測試方法，可將多胜肽結合至固體的支持物（例如，塑膠的支持物，例如微量盤）。此外，也可將多胜肽共價結合至固體的支持珠（例如，瓊脂糖）上。在此多胜肽與支持物之間的共價連結，可藉由在此技藝中所熟知的方法而達成。例如，此多胜肽可藉由將此多胜肽與化學活化形式的支持物反應，而共價連結至支持物（例如，CNBr活化的瓊脂糖4B或EAI瓊脂糖4B，可從Pharmacia獲得）。此外，可將等量的多胜肽放置在微量盤的每個槽孔中，藉此產生一種陣列（array），在這種陣列上可平行地比較多個化合物，或針對結合桿菌的存在分析多個樣本。

### 發明詳述

本發明是有關於一種用於偵測樣本中之結核桿菌的抗體，偵測哺乳動物感染結核桿菌的方法，以及測試化合物之抑制超氧化物歧化酶活性的能力之方法。本發明之形態是產生自結核桿菌所產生之一種新穎的Cu, ZnSOD。

### I. 多胜肽

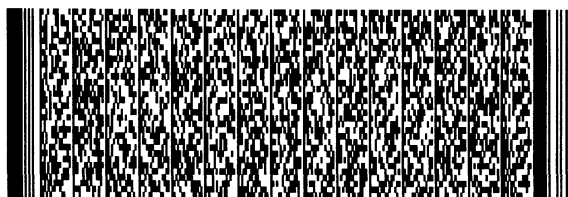


## 五、發明說明 (4)

在本發明之方法中，有效用的Cu，ZnSOD多胜肽包括以下所說明的結核桿菌Cu，ZnSOD多胜肽。在本發明之方法中，有效用的Cu，ZnSOD多胜肽並不限於天然發生的序列。也可使用含有取代、刪除或插入的Cu，ZnSOD，只要那些多胜肽保留至少一種與天然發生之多胜肽相關的活性，並且至少與天然發生之序列有至少50%的相同度。

為了測定兩個序列的相同度百分比，針對理想比較之目的而比對序列（例如，為了與第二個胺基酸序列有理想的比對，可在第一胺基酸序列之中插入間隙）。接著比對在相對應之胺基酸位置的胺基酸殘基。當在第一序列的位置被第二序列中之相對應位置的相同胺基酸殘基所佔據時，則這些分子在那個位置就是相同的。在這兩個序列之間的相同度百分比，是這些序列所共有的相同位置之數目的函數（也就是，相同度%=相同位置的數目/所有位置的數目×100）。

兩個序列之間的同源性及相同度之百分比的測定，可使用數學算法來達成。用於比較兩個序列的數學算法之實例是Karlin等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268 (1990) 的算法，修正版是Karlin等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877 (1993) 的算法。這樣的算法被納入Altschul等人，J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990) 的NBLAST及XBLAST的程式中。BLAST蛋白質搜尋可與XBLAST程式一起執行，分數=50，字長度=3，以得到同源於在本發明的方法中是有用之蛋白質分子



## 五、發明說明 (5)

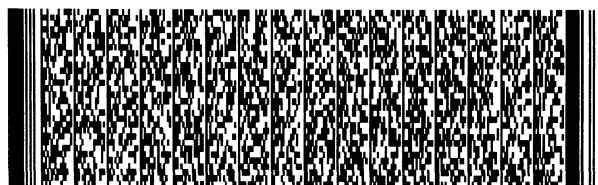
的胺基酸序列。為得到有間隙的比對之比較目的，可使用 Gapped BLAST，如 Altschul 等人，Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997) 所說明。當使用 BLAST 及 Gapped BLAST 程式時，可使用個別程式（例如，XBLAST 及 NBLAST）的預設參數。參見 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。另一個用於比對序列的數學算法是 Myers 等人，CABIOS (1989) 的算法。這樣的算法是併入 ALIGN 程式（第二版）之中，其為 GCG 序列比對套裝軟體的部份。當使用此 ALIGN 程式來比較胺基酸序列時，可使用 PAM120 重量殘基表、12 的間隙長度障礙以及 4 的間隙障礙。

在兩個序列之間的相同度百分比，是使用上述的技術並允許間隙的存在而測定。在計算相同度百分比時，只有完全符合的才計算。

Cu, ZnSOD 的實例是 Cu, ZnSOD-穀胱甘肽-硫-移轉酶融合蛋白質，這不是天然發生的，但在本發明之方法中是有效用的。這樣的蛋白質可在細菌中大量製造，並可藉由穀胱甘肽親合性管柱而輕易地分離。在 SOD 之候選抑制劑的存在或不存在下（例如，候選結核桿菌抗菌劑），此融合蛋白質可接著使用於活體外的 SOD 分析。

## II. 抗體

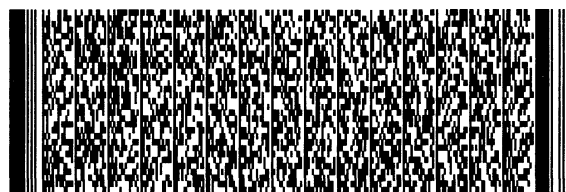
此處所使用的名詞"抗體"，是指免疫球蛋白分子以及免疫球蛋白分子之免疫活性的部份，也就是，包含抗原結合位置的分子，其可專一性地結合至抗原，例如，結核桿



## 五、發明說明 (6)

菌Cu, ZnSOD。專一性地結合至結核桿菌Cu, ZnSOD的分子是可結合結核桿菌Cu, ZnSOD, 但本質上不會與其他樣本中的分子結合之分子, 例如, 一種天然地包含結核桿菌Cu, ZnSOD的生物性樣本。免疫球蛋白之免疫活性部份的實例包括F(ab)及F(ab')<sub>2</sub>片段, 這些片段可藉由以酵素(例如, 胃蛋白酶)處理抗體而產生。本發明提供與結核桿菌Cu, ZnSOD結合的多株以及單株抗體。此處所使用的名詞"單株抗體"或"單株抗體組成物", 是指一群抗體分子, 其只包含一種抗原的結合位置, 這個位置有能力與結核桿菌Cu, ZnSOD之特定的抗原決定位置引起免疫反應。單株抗體組成物因此對於與其免疫反應的結核桿菌Cu, ZnSOD, 典型地表現出單一的結合親合性。

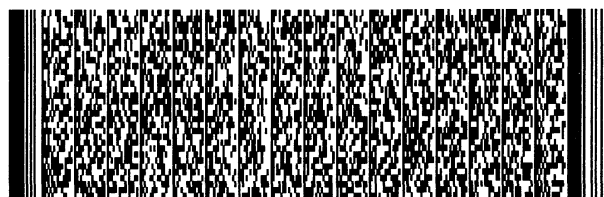
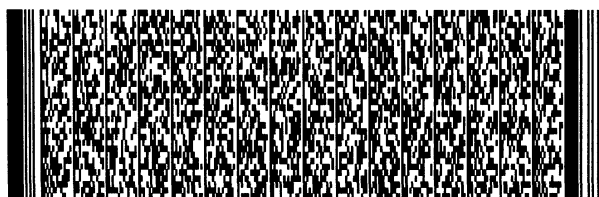
對抗結核桿菌Cu, ZnSOD的多株抗體, 可藉由以結核桿菌Cu, ZnSOD免疫原, 免疫適合的個體而製備。被免疫的個體之抗-結核桿菌Cu, ZnSOD的抗體效價, 可藉由標準方法隨著時間監測, 例如, 使用固定化的結核桿菌Cu, ZnSOD之酵素連結免疫吸附分析(ELISA)。如果需要的話, 針對抗結核桿菌Cu, ZnSOD的抗體分子, 可從哺乳動物中分離(例如, 從血液中), 並進一步藉由熟知的方法而純化, 例如, 藉由蛋白質A管柱色層分析而得到IgG的部份。在免疫後的適當時間, 例如, 當抗結核桿菌Cu, ZnSOD的抗體效價是最高的時候, 可從此個體得到製造抗體的細胞, 並藉由標準技術而製備單株抗體, 例如, 在以下文獻所說明的, Kohler等人, Nature 256: 495-497,



## 五、發明說明 (7)

1975 ; Kozbor 等人 , Immunol. Today 4: 72 , 1983 ; 以及 Cole 等人 , 單株抗體及癌症治療 , Alan R. Liss 公司 , 77-96 頁 , 1985 。用於製造各種單株抗體融合瘤的技術是熟知的 ( 參見 , 例如 , Coligan 等人編輯 , 免疫學的現今方法 , John Wiley & Sons 公司 , 紐約 , 1994 ) 。簡言之 , 將不老衰的細胞系 ( 典型地是骨髓瘤 ) 與淋巴細胞融合 ( 典型地是脾臟細胞 ) , 而此淋巴球細胞是來自以抗結核桿菌 Cu, ZnSOD 作為免疫原而免疫的哺乳動物 , 如上所述 , 並且篩選所產生之融合瘤細胞的培養上清液 , 鑑定會製造與結核桿菌 Cu, ZnSOD 結合之單株抗體的融合瘤。

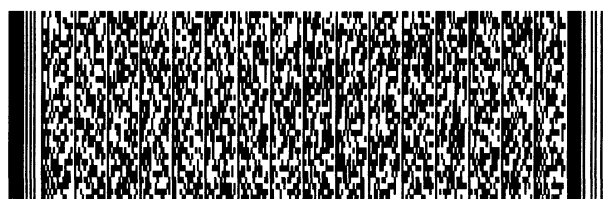
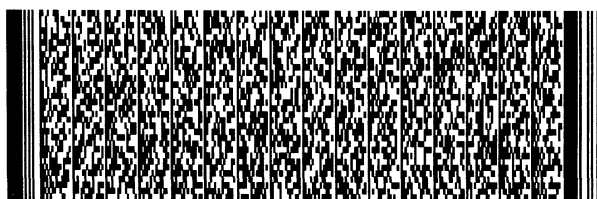
許多用來融合淋巴球細胞與不老衰之細胞系的熟知方法中的任何一種 , 皆可應用於產生對抗結核桿菌 Cu, ZnSOD 之抗體的目的 ( 參見 , 例如 , 免疫學的現今方法 , 同上 ; Galfre 等人 , Nature 266: 55052 , 1977 ; Kenneth , 單株抗體 : 生物學分析的新方面 , Plenum Publishing 公司 , 紐約 , 1980 ; 以及 Lerner Yale J. Biol. Med. , 54:387-402 , 1981 ) 。此外 , 習知此技藝的工作者將會體認 , 在這樣的方法中有許多變異也是有用的。典型地 , 不老衰的細胞系 ( 例如 , 骨髓瘤細胞系 ) 是衍生自與淋巴球細胞相同的哺乳動物。例如 , 藉由將來自本發明之免疫原製備物所免疫的老鼠之淋巴細胞 , 與不老衰的老鼠細胞系融合而製作成老鼠的融合瘤 , 例如 , 對含有次黃嘌呤、胺基蝶呤及胸腺核苷的培養基 ("HAT 培養基") 敏感的骨髓瘤細胞系。許多骨髓瘤細胞系的任何一種細



## 五、發明說明 (8)

胞系，根據標準技術，皆可用於融合的合作夥伴，例如 P3-NS1/1-Ag4-1，P3-x63-Ag8 或 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤細胞系。這些細胞系可從 ATCC 獲得。典型地，使用聚乙二醇 ("PEG") 將對 HAT 敏感的老鼠骨髓瘤細胞與老鼠脾臟細胞融合。由此融合所導致的融合瘤細胞，接著用 HAT 培養基篩選，HAT 培養基會殺死未融合的骨髓瘤細胞以及雖融合但無成效的骨髓瘤細胞（未融合的骨髓瘤細胞過幾天就會死亡，因為它們並沒有轉形）。使用標準的 ELISA 分析，針對結合結核桿菌 Cu, ZnSOD 的抗體，藉由篩選融合瘤的培養上清液而偵測製造本發明之單株抗體的融合瘤細胞。

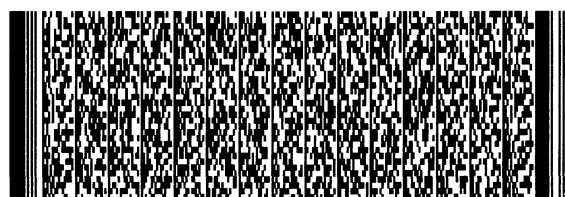
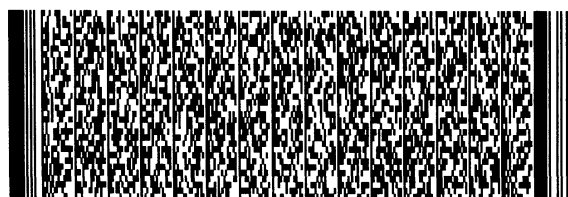
另一種製備分泌單株抗體之融合瘤的方法，是藉由以結核桿菌 Cu, ZnSOD 來篩選重組的組合免疫球蛋白資料庫，而鑑定並分離對抗結合結核桿菌 Cu, ZnSOD 的單株抗體（也就是，抗體噬菌體表現資料庫），藉此分離可結合結核桿菌 Cu, ZnSOD 之免疫球蛋白資料庫的成員。用於產生及篩選噬菌體表現資料庫的套組試劑是商業上可獲得的（例如，Pharmacia 重組噬菌體抗體系統，目錄編號 27-9400-01；以及 Stratagen SurfZAP™ 噬菌體表現套組試劑，目錄編號 240612）。此外，對於使用在產生及篩選抗體表現資料庫是特別經得起考驗的方法及試劑的實例，可在以下文獻中發現，例如，美國專利第 5,223,409 號；PCT 出版編號 WO 92/18619、WO 91/17271、WO 92/20791、WO 92/15679、WO 93/01288、WO 92/01047、WO 92/09690 及 WO 90/02809；Fuchs 等人，Bio/Technology 9:



## 五、發明說明 (9)

1370-1372, 1991; Hay 等人, Hum Antibod Hybridomas 3: 81-85, 1992; Huse 等人, Science 246: 1275-1281, 1989; 以及 Griffiths 等人, EMBO J. 12: 725-734, 1993。

此外, 對抗結核桿菌Cu, ZnSOD的重組抗體, 例如, 嵌合形及人類化的單株抗體, 包括人類及非人類兩個的部份, 可藉由標準的重組DNA技術而達成, 也是在本發明的範圍內。這樣的嵌合形及人類化的單株抗體, 可藉由在此技藝中所熟知的重組DNA技術而製造, 例如, 使用下列文獻所說明的方法, 例如, PCT出版編號WO 87/02671及WO 86/01533; 歐洲專利申請案第184187、171496、173494及125023號; 美國專利第4,816,567及5,225,539號; Better 等人, Science 240: 1041-1043, 1988; Liu 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443, 1987; Lie 等人, J. Immunol. 139: 3521-3526, 1987; Sun 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218, 1987; Nishimura 等人, Canc. Res. 47: 999-1005, 1987; Wood 等人, Nature 314: 446-449, 1985; Shaw 等人, J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559, 1988; Morrison, Science 229: 1202-1207, 1985; Oi 等人, Bio/Techniques 4: 214, 1986; Jones 等人, Nature 321: 552-525, 1986; Verhoeyan 等人, Science 239: 1534, 1988; 以及 Beidler 等人, J. Immunol. 141: 4053-4060, 1988。

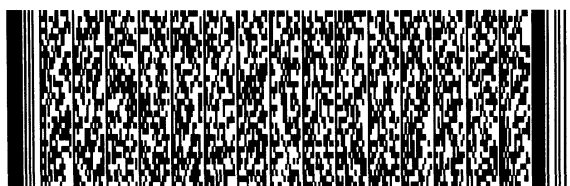


## 五、發明說明 (10)

抗結核桿菌Cu, ZnSOD的抗體(例如,單株抗體),可藉由標準技術(例如,親合性管柱色層分析或免疫沈澱)而分離結核桿菌Cu, ZnSOD。抗結核桿菌Cu, ZnSOD的抗體,可加速來自細菌之天然結核桿菌Cu, ZnSOD的純化,以及表現在宿主細胞之重組製造的結核桿菌Cu, ZnSOD的純化。此外,抗結核桿菌Cu, ZnSOD之抗體,可用來偵測結核桿菌Cu, ZnSOD(例如,在細胞溶胞物中或在血清樣本中),以評估結核桿菌Cu, ZnSOD蛋白質的豐富度。藉由將抗體與可偵測的物質連結在一起而可加速偵測。可偵測的物質之實例包括酵素、輔基、螢光物質、冷光物質、生物冷光物質以及放射性物質。適合的酵素之實例包括,蕈菜過氧化氫酶、鹼性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖酶或乙醯膽鹼脂酶。適合的輔基之實例包括,鏈球菌抗生物素/生物素以及抗生物素/生物素。適合的螢光物質之實例包括,繖形酮、螢光素、異硫氰化螢光素、薔薇紅、二氯三嗪基胺螢光素、二甲胺基脲磺醯氯、藻紅蛋白。冷光材料之實例包括,魯米諾(Luminol)。生物冷光材料之實例包括,蟲螢光素酶、蟲螢光素以及水母發光蛋白(aequorin)。適合的放射性材料之實例包括, $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 或 $^3\text{H}$ 。

## III. 以Cu, ZnSOD接觸一化合物

對於活體外的分析,可藉由將Cu, ZnSOD與此化合物在溶液、懸浮液或凝膠中混合,而使Cu, ZnSOD接觸化合物。這個溶液、懸浮液或凝膠接著用於SOD分析。



#### 五、發明說明 (11)

對於細胞分析，任何Cu, ZnSOD多胜肽可在細胞中表現，如果此細胞並不是已經表現Cu, ZnSOD的，或任何Cu, ZnSOD多胜肽可在細胞中過度表現，如果此細胞已經表現Cu, ZnSOD的話。在細胞表現蛋白質的方法是在此技藝中所熟知的。

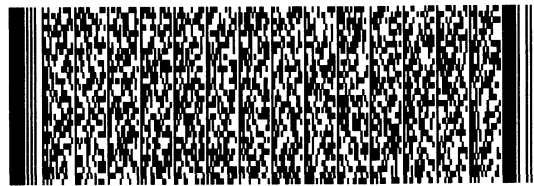
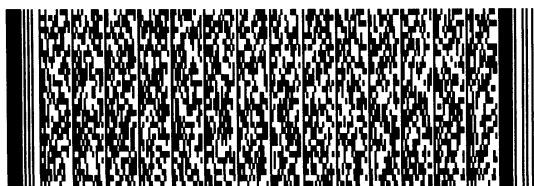
如果Cu, ZnSOD在細胞中，化合物可藉由在此技藝中所熟知的方法輸送至細胞內。如果此化合物是可通透膜的分子，則此化合物可直接與此細胞混合，使得Cu, ZnSOD與此化合物接觸。如果此化合物不是可通透膜的分子，就像是許多大分子所被預期的，或者如果此化合物是多胜肽、核酸或病毒載體，那麼此化合物可藉由電轉殖輸送至細胞內。

此外，細胞可以是活體內的動物細胞。此化合物可藉由任何在此技藝中所習知的途徑輸送至此細胞，包括靜脈內注射。另外，如果輸送至細胞是需要的，多胜肽化合物可藉由核酸或病毒載體而給藥。

#### IV. 以Cu, ZnSOD接觸一化合物

對於超氧化物歧化酶活性的分析可藉由任何在此技藝中所知的標準技術而測定。例如，參見說明於Beauchamp等人，Anal. Biochem. 44: 276-287, 1971以及其中之參考文獻的分析方法。

許多的這些分析是依靠氮藍四噬 (NBT) 的光還原，其為一種由超氧化物歧化酶之製造所調節的過程。超氧化物歧



## 五、發明說明 (12)

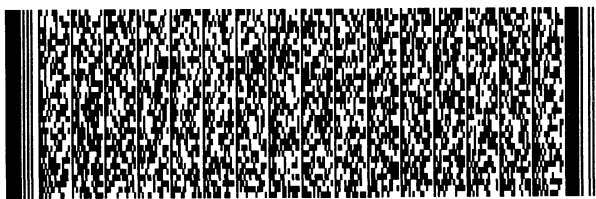
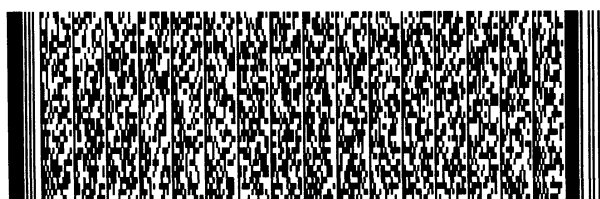
化酶的活性是反應在NBT之還原的抑制上。曝露適當光源於NBT會使之轉變成藍色染劑，可藉由560nm的吸光值而定。然而在超氧化物歧化酶存在的情況下，NBT之光還原成藍色染劑的情形會減少或排除。基於此概念的特殊程序是在此技藝中已知的。例如，參見以下所說明的程序。

不需詳細闡述，基於以上的揭露及以下的說明，相信熟悉此技藝者可利用本發明於極致。以下的實施例只是說明熟悉此技藝者如何實施此發明，並非用以限制此揭露之其餘部份。任何在此揭露中所引用的出版物，都併入為參考資料。

實施例1：選殖結核桿菌Cu, ZnSOD並描述其特性

分別使用大腸桿菌株KL1 blue (Stratagen) 以及BL21 (BL21) (Novagen) 於選殖及重組蛋白質的過度表現。使用結核桿菌H37Rv作為電子顯微鏡分析。

根據標準方法執行選殖程序。藉由PCR從結核桿菌的基因組將sodC基因的片段放大，使用寡核苷酸對5'-CATATGTCTACAGTTCCGGGTACCA-3' (序列辨識編號3) 以及5'-GGATCCAAGCTAGCCGGAACCAATGA-3' (序列辨識編號4)，以用於全長的選殖，而5'-CATATGCCAAAGCCCGCCGATCA-3' (序列辨識編號5) 以及5'-GGATCCAAGCTAGCCGGAACCAATGA-3' (序列辨識編號6) 則用於截短形式的選殖 (說明如下)。將此PCR產物選殖進入T-載體pT7-Blue (Novagen)，並本質上地次選殖進



## 五、發明說明 (13)

入表現載體pET15B (Novagen) 的NdeI及BamHI位置。根據製造商的操作說明，使用ABI BigDye (PE Applied Biosystems) 螢光定序化學及ABI PRISM 310 基因分析自動定序儀 (PE Applied Biosystems)，而將此選殖之片段的兩股定序。

定序的結果顯示sod C基因包含下列開放譯讀架：

```
ATGCCAAAGCCCGCCGATCACCGCAATCACGCAGCTGTCAGC
ACGTCGGTCCTGTCCGCGTTGTTTCTGGGCGCCGGTGCCGCG
CTGCTGAGCGCATGCTCGTCGCCGACGACGCGTCTACAGTT
CCGGGTACCACGCCGTCGATTTGGACCGGATCGCCCGCGCCG
TCGGGACTTTCGGGTCACGACGAGGAGTGCCCCGGTGCGCAG
AGCCTGACCAGTACCCTGACGGCGCCCGACGGCACGAAGGTA
GCGACCGCGAAGTTCGAGTTCGCCAACGGCTATGCCACCGTC
ACGATCGCGACGACCGGCGTCCGGTAAGCTCACGCCCGGCTTC
CACGGCCTACACATCCACCAGGTGGGTAAGTGTGAGCCCAAC
TCGGTTGCCCCACCGGCGGTGCGCCCGGCAACTTTCTGTCC
GCCGGCGGCCACTACCAGTGCCAGGGCATAACGGCACCCCC
GCCAGCGGCGACCTGGCCTCGCTGCAGGTACGCGGTGACGGT
TCGGCGATGCTGGTGACCACCACCGACGCCTTACCATGGAC
GACCTGCTGAGCGGCGCGAAAACCGCGATCATTCACGCC
GGCGCCGACAACTTTGCCAACATTCCGCCAGAACGCTACGTC
CAGGTCAATGGGACTCCGGGTCCCGACGAGACGACGTTGACC
ACCGGCGACGCCGGCAAGCGGGTGGCGTGCGGTGTCATTGGT
TCCGGC (SEQ ID NO:1).
```



## 五、發明說明 (14)

此開放譯讀架結束於一個緊接於上述序列的天然TAG停止密碼。此開放譯讀架編碼一段240個胺基酸的多胜肽，其序列如下：

```

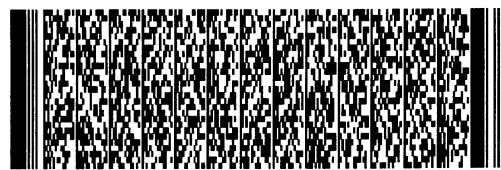
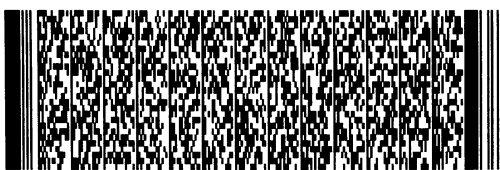
MPKPADHRNHAAVSTSVLSALFLGAGAALLSACSSPOHASTV
PGTTPSIWTGSPAPSGLSGHDEESPGAQSLTSTLTAPDGTKV
ATAKFEFANGYATVTIATTGVGKLTPGFHGLHIHQVGKCEPN
SVAPTGGAPGNFLSAGGHYHAVPGHTGTPASGDLASLQVRGDG
SAMLVTTTDAFTMDDL LSGAKT AIIHAGADNFANIPPERYV
QVNGTGPDETTLTG DAGKRVACGVIGS (SEQ ID
NO:2) .

```

使用PSORT程式分析 (<http://psort.nibb.ac.jp/>)，在這個多胜肽的胺基端發現一個推定的訊息胜肽 (畫底線者)。

使用編碼上述SOD版本的pET15B表現載體，將BL21 (DE3)細胞轉形。L-sodC質體包括序列辨識編號1。S-sodC質體包括序列辨識編號1的核苷酸118-720，也就是不包括編碼訊息胜肽的序列。M-sodC質體包括核苷酸118-720，在天然停止密碼的T變成A，因此變成編碼離胺酸。接著在編碼新的離胺酸之密碼的下游加入額外的序列

(CCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGGCTGCTAA：序列辨識編號7)，藉此編碼額外的胺基酸序列 PNNSSTLAAVTSGSGC (序列辨識編號8)。藉由將此攜帶重

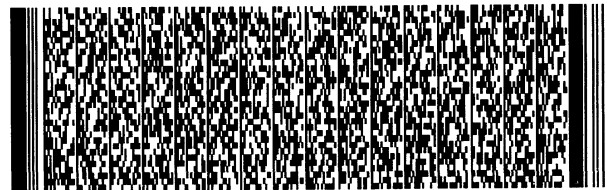
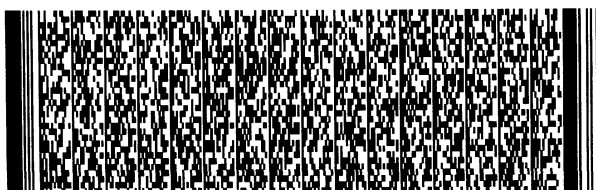


## 五、發明說明 (15)

組sodC質體的BL21 (DE3)細菌，在包含0.5 mM IPTG的LB培養液，以37°C培養100分鐘而誘導此重組蛋白質的表現。藉由離心而回收細菌，並經由在10 mM磷酸緩衝液 (pH 7.4) 及10 mM咪唑的超音波震盪而使細胞溶解。在包涵體 (inclusion bodies) 中的重組蛋白質是變性的，並溶解於20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl、8M 尿素及50 mM咪唑。接著根據製造商操作說明，將蛋白質在抓取組織胺酸的管柱上 (Pharmacia) 純化。藉由在4°C對抗50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM CuSO<sub>4</sub> 以及1 mM ZnSO<sub>4</sub> 的透析，而將純化的重組蛋白質還原 (renature)，其中的透析液更換數次。將純化的蛋白質儲存於添加20%甘油的透析液。溶解於不含細胞之萃取液的重組蛋白質，則是使用相同的管柱在自然條件下而純化 (也就是，以不含CuSO<sub>4</sub> 的透析液)。

大部分基於IPTG之誘導過度表現的這些蛋白質，是存在於不可溶的包涵體內。這些在包涵體之中的蛋白質是變性的，以尿素溶解，並純化以接近均質，如同以考馬斯 (Coomassie) 亮藍R-250染色之SDS-PAGE所顯示的。小部份的這些蛋白質也是以溶解的形式而從細胞溶胞物純化。此SDS-PAGE也顯示L-sodC表現大約28-32仟道耳吞的分子量，M-sodC表現大約26仟道耳吞的分子量，而S-sodC表現大約24-25仟道耳吞的分子量。

藉由把在Coomassie 亮藍R-250染色之SDS-PAGE上的親和性純化的M-sodC 分成幾部份，而製備用於抗體製造的



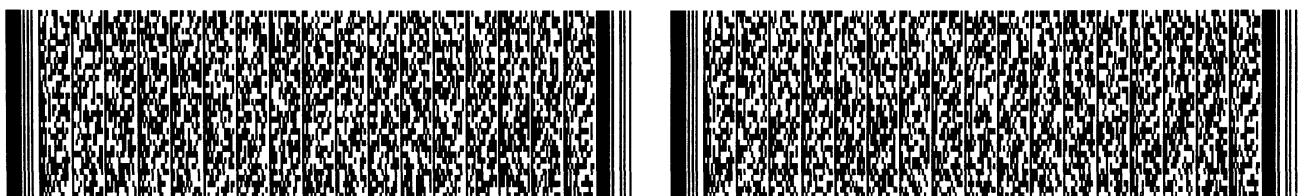
## 五、發明說明 (16)

M-sodC。將含有此M-sodC的凝膠切片與完全弗洛依德氏(Freund's)佐劑混合，並將此混合物免疫至三月大的新祁安島(Zealand)白兔。在起初的免疫之後，接著以混合於不完全Freund's佐劑的蛋白質追加免疫三次。在最後依次追加後的十天之間，收集抗血清。

將欲分析的蛋白質樣本在SDS-PAGE中分成幾個部份，電轉漬至Immobilon TM-P膜上(Millipore)，以兔子抗血清，接著以驢的抗兔IgG抗體(結合蕁菜過氧化氫酶)(Amersion)偵測。以提升的化學冷光套組試劑(ECL, Amersion)偵測目標條帶，並以Hyperfilm-MP底片記錄。

對抗此純化之重組M-sodC蛋白質的兔子多株抗血清可辨識所有的三種形式的SOD蛋白質，並且不會與大腸桿菌之sodC基因產物有交互作用。更重要的是，此抗血清在結核桿菌溶胞物中辨識一個大小約26千道耳吞的單一多胜肽，證明此sodC序列表現蛋白質。這個發現亦暗示結核桿菌SOD是加工變為成熟的形式並分泌，如同以上所預測。

為了評估此重組白質之SOD酵素活性，將此細菌表現的蛋白質重新懸浮於50 mM磷酸緩衝液(pH 7.8)及0.1 mM EDTA之中，經由超音波震盪並且離心以得到細菌萃取液。藉由非變性的聚丙烯醯胺凝膠將此萃取液分開，以NBT染色，並曝露於光線下，如同說明於Beauchamp，同上文獻，而評估SOD的活性。已知1 mM KCN會選擇性地抑制Cu, ZnSOD活性，因此將之加入控制組樣本中以確認SOD活性是來自於Cu, ZnSOD酵素。

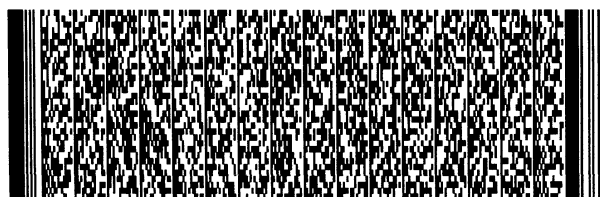


## 五、發明說明 (17)

大部分表現在大腸桿菌的結核桿菌Cu, ZnSOD是發現於不溶的包涵體之中，並且不具有任何酵素活性。為了重新建構此酵素活性，將來自包涵體所製備之純化的重組蛋白質以尿素變性，並藉由在Cu<sup>2+</sup>及Zn<sup>2+</sup>之溶液中透析而還原。從包涵體純化出來之還原的重組M-sodC蛋白質在藍色NBT-染色的凝膠上形成多重白色條帶。這些條帶可能代表活性的重組蛋白質之多樣構形。

從可溶的細胞質部份純化出來的重組Cu, ZnSOD (S-sodC)，在藍色NBT-染色的凝膠上表現出單一的白色條帶。當凝膠在1 mM KCN的存在下染色時，表現結核桿菌Cu, ZnSOD (S-sodC)、酵母菌Cu, ZnSOD以及結核桿菌Cu, ZnSOD (M-sodC)之還原形式的白色條帶都消失。這個結果證明由結核桿菌sodC基因所編碼的蛋白質，是編碼一種以Cu, Zn為輔助因子的真實超氧化物歧化酶。

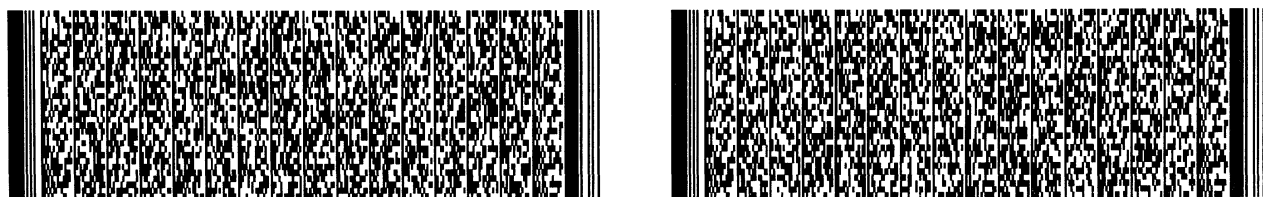
為了測定Cu, ZnSOD的細胞分隔，將L-sodC酵素在大腸桿菌中表現，然後依下面方法將此細菌用作免疫金粉標示的電子顯微鏡分析。製備15 nm的膠狀金粉-IgG複合物並如同Lin等人，J. Ultrastruct. Res. 84: 16-23, 1983；以及Chang等人，J. Gen. Virol. 78: 1175-1179, 1997所說明的方法執行免疫金粉標示。簡言之，將一些結核桿菌的菌落從洋菜膠上刮下，並以4℃在1%的福馬林及0.1 M的磷酸檸檬酸緩衝液 (pH 7.2) 中，固定過夜。將此固定的樣本以0℃，在0.1 M的氯化銨及0.1 M的磷酸檸檬酸緩衝液 (pH 7.2) 中，中和30分鐘。中



## 五、發明說明 (18)

和之後，接著透過一系列的甲醇清洗而脫水，第一次是在0℃用50%甲醇清洗15分鐘，接著以75%及90%的甲醇重複，接著以100%的甲醇在-20℃清洗兩次，每次1小時。以高級的包埋劑LR Gold滲透此脫水的樣本。首先藉由浸在25%的LR Gold、10%PVP-6000中，-20℃，1小時而滲透此樣本。接著將此樣本浸在50%的LR Gold、10%PVP-6000中，-20℃，2小時，然後是75%LR Gold，-20℃，4小時。最後，以100%的LR Gold，-20℃，2小時，將此樣本完全滲透。在-20℃，以長波紫外光輻射達24小時而啟動包埋劑的聚合作用，並且此樣本在室溫中24小時而變硬。將LR Gold包埋的樣本之超薄切片(100 nm)固定在200篩孔鎳網(其以碳支撐的膠棉薄膜覆蓋)。將網上的切片以3%正常山羊血清(溶於PBS)封阻3分鐘，培養於對抗Cu, ZnSOD的兔血清(參見上述)中15分鐘，以1%正常山羊血清(溶於PBS)清洗，並且培養於膠狀金粉-IgG複合物中10分鐘。在以醋酸鈾和檸檬酸鉛對照之前，以三重玻璃蒸餾水廣泛地清洗網子。此切片以Zeiss EM109電子顯微鏡(Zeiss, 德國)檢驗。

因為格蘭氏陽性的結核桿菌沒有胞漿周圍的空隙，因此可檢驗出Cu, ZnSOD分泌至細菌的周圍。使用免疫金粉標示以及電子顯微鏡，顯示Cu, ZnSOD主要位於結核桿菌的周圍。這個發現與上述的發現一致，就是(1) Cu, ZnSOD具有一推定的訊息胜肽序列，以及(2)成熟之天然發生的Cu, ZnSOD表現出類似於SDS-PAGE凝膠上之截短



### 五、發明說明 (19)

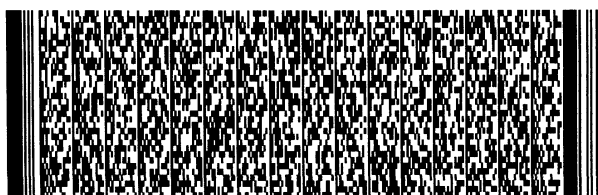
S-sodC蛋白質的大小。這些資訊暗示結核桿菌Cu, ZnSOD不是分泌就是附著在細菌的外表上。

在分開的實驗中，在大腸桿菌表現結核桿菌Cu, ZnSOD。接著使用上述之免疫金粉標示的電顯測定所表現之蛋白質的位置。染色的結果顯示Cu, ZnSOD主要位於細菌的胞漿周圍的空隙。因此，這個蛋白質可被重組地製造，並在細胞中分泌，這對大量製造此蛋白質是適合的。

### 實施例2：用於偵測結合桿菌的酵素連結免疫吸附分析 (ELISA)

因為結核桿菌Cu, ZnSOD是曝露於細胞的外面，所以藉由使用專一於Cu, ZnSOD的抗體而發展ELISA的偵測分析。以1.22、4.88、19.5、78.1、312或1250 ng/ml的S-sodC溶液，藉由在4°C培養隔夜而覆蓋於槽孔上。接著移除蛋白質，並以10%的胎牛血清（溶於PBST）在37°C封阻槽孔2小時。以PBST清洗槽孔三次，並加入稀釋1:4000的兔血清（在上述實施例1所得到的）。將兔血清在4°C下，隔夜培養於槽孔中。之後，以PBST清洗槽孔三次，並加入稀釋1:1000的驢之抗兔IgG抗體（結合蕈菜過氧化氫酶）（Amersion，目錄編號NA943）。將驢抗體在37°C下，培養於槽孔中達6小時。再以PBST清洗槽孔三次，然後藉由加入TMB（KPL公司）而顯色，不要放在室溫下超過30分鐘。藉由加入1 M  $H_3PO_4$ 而終止反應。

450 nm的吸光讀值，在10 ng及1000 ng之間顯示出動



#### 五、發明說明 (20)

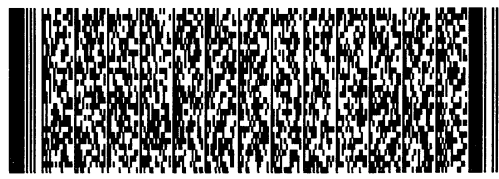
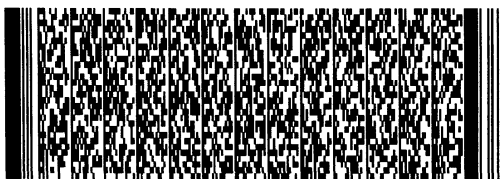
態的或可計量的偵測範圍。例如，含有超過1000 ng的樣本，讀值就不再有動力。這個結果顯示藉由使用專一於Cu, ZnSOD的抗體可發展用於偵測結核桿菌之有用的ELISA方法。

#### 實施例3：偵測結合桿菌的感染

因為結核桿菌Cu, ZnSOD是曝露於細胞外的環境，所以可檢驗結核病人產生對抗Cu, ZnSOD之抗體的能力。使用病人血清，以西方墨漬法偵測上述的結核桿菌Cu, ZnSOD。結果顯示110個病人有12個製造對抗Cu, ZnSOD的抗體，證實在個體中對抗這個蛋白質的抗體之存在可用作結核病代用標記。

#### 其他具體實施例

應了解的是，雖然本發明已連同其詳述而說明，但前面的說明是用以舉例而非限制本發明的範圍，本發明的範圍是藉由後附的申請專利範圍而定義。其他形態、優點、以及修飾是在本發明的範圍內。



72年10月21日 修正

92年10月21日

修正公告本

申請日期：

88.11.10

案號：88119632

類別：

A61K 39/62, 39/64, 39/40, 39/695

C12N 1/00, Y12

(以上各欄由本局填註)

# 發明專利說明書

575426

一、發明名稱	中文	結核桿菌之超氧物歧化酶
	英文	MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SUPEROXIDE DISMUTASE
二、發明人	姓名(中文)	1. 李芳仁 2. 吳忠勳
	姓名(英文)	1. 2.
	國籍	1. 中華民國 2. 中華民國
	住、居所	1. 台北市石牌路二段326號1樓 2. 台北市內湖區成功路二段305巷9號5樓
三、申請人	姓名(名稱)(中文)	1. 永信藥品工業股份有限公司
	姓名(名稱)(英文)	1.
	國籍	1. 中華民國
	住、居所(事務所)	1. 台中縣大甲鎮中山路一段1191號
	代表人姓名(中文)	1. 李天德
代表人姓名(英文)	1.	

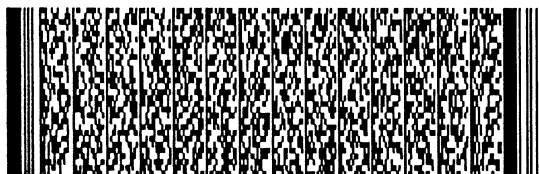


## 四、中文發明摘要 (發明之名稱：結核桿菌之超氧化物歧化酶)

本發明是有關於結核桿菌超氧化物歧化酶的抗體，使用它們以用於偵測結核桿菌的方法，測試結核桿菌超氧化物歧化酶之抑制劑的方法，以及偵測感染結核桿菌的方法。

## 英文發明摘要 (發明之名稱：MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SUPEROXIDE DISMUTASE)

The invention relates to Mycobacterium tuberculosis superoxide dismutase antibodies, methods of using them for detection of M. tuberculosis, methods of testing for an inhibitor of an M. tuberculosis superoxide dismutase, and methods of detecting tuberculosis infection.



## 六、申請專利範圍

1. 一種銅/鋅超氧化物歧化酶之抗體，其係專一地結合至由序列辨識編號2之胺基酸序列所組成的多胜肽之抗體，上述序列辨識編號2之胺基酸序列係如下所示：

MPKPADHRNHAAVSTSVLSALFLGAGAALLSACSSPQHASTV  
PGTTPSIWTGSPAPSGLSGHDEESPGAQSLTSTLTAPDGTKV  
ATAKFEFANGYATVTIATTGVGKLTGPFHGLHIHQVGKCEPN  
SVAPTGGAPGNFLSAGGHYHAVPGHTGTPASGDLASLQVRGDG  
SAMLVTTTDAFTMDDL LSGAKTAII IHAGADNFANIPPERYV  
QVNGTPGPDETTLTTGDAGKRVACGVIGS。

2. 如申請專利範圍1所述之銅/鋅超氧化物歧化酶之抗體，其中該抗體是單株抗體。

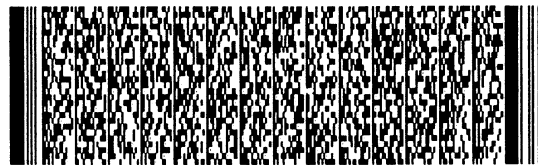
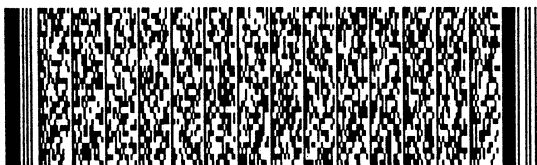
3. 一種在哺乳動物中偵測感染結核桿菌的方法，該方法包括：

提供一段包括如下示之序列辨識編號2之胺基酸序列的多胜肽：

MPKPADHRNHAAVSTSVLSALFLGAGAALLSACSSPQHASTV  
PGTTPSIWTGSPAPSGLSGHDEESPGAQSLTSTLTAPDGTKV  
ATAKFEFANGYATVTIATTGVGKLTGPFHGLHIHQVGKCEPN  
SVAPTGGAPGNFLSAGGHYHAVPGHTGTPASGDLASLQVRGDG  
SAMLVTTTDAFTMDDL LSGAKTAII IHAGADNFANIPPERYV  
QVNGTPGPDETTLTTGDAGKRVACGVIGS；

在足以使抗體結合至該多胜肽的條件下，將該多胜肽與收集自哺乳動物的生物性樣本接觸；以及

測定結合至該多胜肽之抗體的存在，其中該抗體的存在表示該哺乳動物感染結核桿菌。



## 六、申請專利範圍

4. 如申請專利範圍3所述之方法，更包括移除不與該多胜肽結合的抗體。

5. 如申請專利範圍3所述之方法，其中該多胜肽結合至一固體支持物。

6. 如申請專利範圍5所述之方法，其中該固體支持物是塑膠。

7. 如申請專利範圍5所述之方法，其中該多胜肽是共價結合至該固體支持物。

8. 如申請專利範圍3所述之方法，其中該哺乳動物是人類，並且該生物性樣本是人類血清樣本。

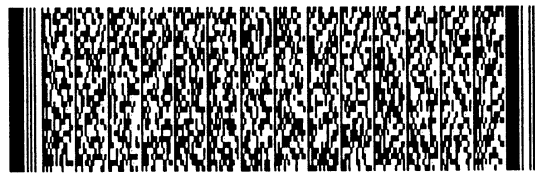
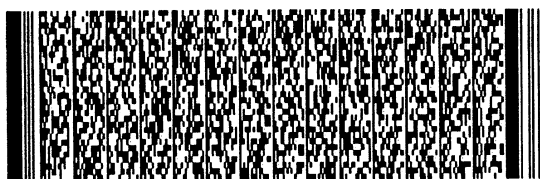
9. 一種測試化合物是否抑制多胜肽之超氧化物歧化酶活性的方法，該方法包括：

將此化合物與一多胜肽接觸，此多胜肽是銅/鋅超氧化物歧化酶，並具有與如下示之序列辨識編號2至少50%相同度的胺基酸序列：

```
MPKPADHRNHAAVSTSVLSALFLGAGAALLSACSSPQHASTV
PGTTPSIWTGSPAPSGLSGHDEESPGAQSLTSTLTAPDGTKV
ATAKFEFANGYATVTIATTGVGKLTPGFHGLHIHQVGKCEPN
SVAPTGGAPGNFLSAGGHYHAVPGHTGTPASGDLASLQVRGDG
SAMLVTTTDAFTMDDL LSGAKTAII IHAGADNFANIPPERYV
QVNGTPGPDETTLTGDAGKRVACGVIGS ;
```

測量該多胜肽所表現之超氧化物歧化酶活性的程度；以及

比較該化合物存時與不存在時之超氧化物歧化酶活性的程度；



## 六、申請專利範圍

其中，當該化合物存在時的超氧化物歧化酶活性之程度是比該化合物不存在時的超氧化物歧化酶活性之程度還要低的時候，該化合物抑制該多胜肽的超氧化物歧化酶活性。

10. 如申請專利範圍9所述之方法，其中該多胜肽結合至固體支持物。

11. 如申請專利範圍10所述之方法，其中該固體支持物是塑膠。

12. 如申請專利範圍10所述之方法，其中該固體支持物是一陣列，而且該多胜肽結合至該陣列的每個元件上。

13. 如申請專利範圍9所述之方法，其中該多胜肽是在細胞內。

14. 如申請專利範圍13所述之方法，其中該細胞是細菌細胞。

15. 如申請專利範圍9所述之方法，其中該胺基酸序列與序列辨識編號2至少有70%的相同度。

16. 如申請專利範圍15所述之方法，其中該胺基酸序列與序列辨識編號2至少有90%的相同度。

17. 如申請專利範圍16所述之方法，其中該胺基酸序列是序列辨識編號2。

