



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11) Número de publicación: **2 356 383**

51) Int. Cl.:

**C12N 15/40** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C07K 14/19** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96) Número de solicitud europea: **06022216 .3**

96) Fecha de presentación : **24.10.2006**

97) Número de publicación de la solicitud: **1780282**

97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2007**

54

Título: **Expresión recombinante de variantes de proteína de cubierta de rubeola E1 como proteínas de fusión chaperonas, y utilización de las mismas en la detección de anticuerpos anti-rubeola.**

30

Prioridad: **26.10.2005 EP 05109993**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.04.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.04.2011**

73

Titular/es: **ROCHE DIAGNOSTICS GmbH**  
**Sandhofer Strasse 116**  
**68305 Mannheim, DE**  
**F. Hoffmann-La Roche AG.**

72

Inventor/es: **Bollhagen, Ralf;**  
**Engel, Alfred;**  
**Faatz, Elke;**  
**Schaarschmidt, Peter;**  
**Scholz, Christian;**  
**Upmeier, Barbara y**  
**Zarnt, Toralf**

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 356 383 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

Expresión recombinante de variantes de proteína de cubierta de rubeola E1 como proteínas de fusión chaperonas, y utilización de las mismas en la detección de anticuerpos anti-rubeola.

### 5 **Campo de la invención**

10 La invención se refiere a un antígeno soluble de la rubeola E1 y a variantes de este péptido caracterizados porque no presentan en el extremo C-terminal por lo menos la región transmembranal y el segmento de anclaje, así como por lo menos los aminoácidos 143 a 168 y que contiene por lo menos la región comprendida entre los puentes disulfuro Cys 349-Cys 352 y Cys 368-401 y que comprende por lo menos los aminoácidos 315 a 412 de la secuencia de rubeola E1, mientras que el antígeno de rubeola E1 se encuentra fusionado con una chaperona FKBP.

### 15 **Antecedentes de la invención**

15 El virus de la rubeola (RV) es un togavirus y el único representante del subgrupo Rubivirus. El virus, pequeño y con cubierta, presenta un tamaño de 65 nm y consiste de una única molécula de ARN de una cadena de 10 kb encapsulado en una nucleocápside icosaédrica que se encuentra circundada por una cubierta lipídica. El virus de la rubeola provoca una enfermedad infantil relativamente leve (sarampión alemán) que habitualmente resulta en inmunidad permanente  
20 que se cree que se encuentra mediada por tanto linfocitos T como anticuerpos. Las posibles consecuencias de las infecciones por rubeola en adultos son artritis transitoria/crónica, síndromes musculoesqueléticos, diabetes mellitus insulino-dependiente y aparición retardada de secuelas neurológicas.

25 El virus de la rubeola es un parámetro importante durante las primeras etapas del embarazo. La detección específica de IgM anti-rubeola y/o de IgG anti-rubeola, respectivamente, resulta crucial para la clarificación de si se ha producido una infección aguda o una reinfección activa.

30 La infección materna por virus de la rubeola durante el embarazo se asocia a riesgo de síndrome de rubeola congénita (CRS) en el feto, siendo más alta la incidencia de malformaciones congénitas cuando la infección primaria se produce en las primeras 12 semanas de la gestación. Por este motivo, la prevención de anomalías congénitas causadas por la infección por RV durante el embarazo temprano requiere la determinación del estado inmunológico del individuo mediante serología, es decir una determinación selectiva de los anticuerpos IgG e IgM específicos para los antígenos del virus de la rubeola. La infección primaria por rubeola se asocia a una respuesta específica de anticuerpos IgM, mientras que los niveles elevados de IgG en ausencia de IgM detectable indica un estado inmunológico que es protector frente a la infección aguda por virus de la rubeola.  
35

40 En el caso de que el cribado prenatal indique que la mujer ha adquirido una infección primaria por rubeola durante las etapas iniciales del embarazo, con frecuencia se recomienda un aborto terapéutico. En consecuencia, resulta imperativo que los resultados de la prueba sean exactos.

45 Para detectar anticuerpos contra RV, el diagnóstico rutinario de laboratorio se basa principalmente en los ensayos ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzima), mientras que el método más ampliamente aceptado para determinar el estado inmunológico del RV en Europa central es la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HAI) para verificar el ensayo ELISA de Ig del RV (Weber, 1997).

50 La detección de anticuerpos específicos de una determinada clase de inmunoglobulina puede llevarse a cabo uniendo la inmunoglobulina a una fase sólida en la que se ha inmovilizado antígeno específico. La inmunoglobulina unida posteriormente se detecta con un anticuerpo marcado específico para inmunoglobulinas humanas de una clase determinada. Este formato de ensayo únicamente puede llevarse a cabo mediante un formato de ensayo de dos etapas, incluyendo una etapa de lavado para eliminar las inmunoglobulinas no unidas antes de la detección. Un formato de ensayo de una etapa con frecuencia realizado en analizadores automáticos de inmunoensayo requiere el formato de ensayo directo de un sándwich de doble antígeno, es decir, el anticuerpo específico forma un complejo inmunológico que se une a un primer antígeno que se inmoviliza en una fase sólida o que media en la inmovilización en una fase sólida, y un segundo antígeno que porta un marcaje, permitiendo de esta manera la detección cuantitativa o cualitativa del anticuerpo unido específicamente.  
55

60 La determinación selectiva de anticuerpos IgG específicos en presencia de anticuerpos IgM de la misma especificidad en un formato sándwich de doble antígeno en una etapa requiere estrictamente la utilización de antígenos solubles monoméricos u oligoméricos definidos (patente EP n° 0 944 838), revelando conformaciones inmunorreactivas.

65 El virus de la rubeola incluye cuatro proteínas estructurales que se ha demostrado que son antigénicas en animales y en seres humanos. Existen tres glucoproteínas de cubierta: E1 (58 kDa), E2a (47 kDa) y E2b (42 kDa) y la proteína de cápside (C) no glucosilada (33 kDa) que decora la cadena positiva de ARN monocatenario que forma el genoma vírico (Waxham y Wolinsky, 1985a; Oker-Blom *et al.*, 1984).

Se ha demostrado que E2a y E2b son variantes del mismo producto génico y la diferencia de migración en gels de poliacrilamida se debe a la glucosilación heterogénea de las proteínas. Se ha encontrado que E1 y E2 forman monómeros o complejos unidos por disulfuro (E1-E1 y E1-E2), mientras que C existe exclusivamente como

## ES 2 356 383 T3

homodímero (Waxham y Wolinsky, 1983; Wolinsky, 1996). Una revisión extensa de las propiedades biológicas, físicas y bioquímicas del RV, así como de las características clínicas de la infección ha sido publicada por Wolinsky (1996).

5 En la actualidad, se utilizan antígenos para la detección de una infección por rubeola, que se derivan de líneas celulares establemente infectadas/transfectadas y, en general, se originan en la sobreproducción eucariótica. Seppänen *et al.* (1991) describe la expresión de E1 y E2 del virus de la rubeola en células de insecto Sf9 de *Spodoptera frugiperda* mediante la utilización de un sistema de expresión baculovírico. Asimismo, Seto (1994) da conocer la expresión de E1 soluble en un sistema baculovírico. Además, se da a conocer en Hobman *et al.* (1994) una línea celular CHO  
10 establemente transfectada que expresa y secreta las proteínas estructurales E1, E2 y C del RV en forma de partículas de tipo RV (RLPs).

Las partículas de tipo rubeola están compuestas de los antígenos principales de la rubeola E1, E2 y C, que se expresan en forma de proteínas precursoras de polipéptidos víricos. Debido a secuencias de señal, estas proteínas precursoras no procesadas se secretan al medio y se forman partículas de tipo vírico. La superficie de estas RLPs presenta epítomos adecuados para la detección inmunológica de anticuerpo anti-RV en los sueros positivos para rubeola. La expresión de partículas de tipo RV no infecciosas (VLPs) que contienen las tres proteínas estructurales del RV en la línea celular BHK (células renales de hámster neonato) se describe de manera general en Qui *et al.*, 1994.

20 Sin embargo, la producción de antígenos del RV en sistemas celulares eucarióticos es laboriosa y requiere mucho tiempo, y el rendimiento es comparativamente reducido. El establecimiento de métodos diagnósticos *in vitro* de detección de anticuerpos anti-virus rubeola requiere procedimientos de producción de antígenos recombinantes del RV procedentes de organismos procarióticos como *E. coli* de calidad definida, soluble, funcional y reproducible, con claras ventajas respecto a las RLPs establecidas.

25 Aunque se está avanzando rápidamente en la materia del diseño y manipulación de proteínas, los antígenos de la rubeola E1, E2 y C se expresan con una abundancia muy reducida en las células huésped de *E. coli* y, además, presentan una solubilidad reducida.

30 El antígeno de rubeola inmunodominante, es decir, el antígeno de elección para la detección inmunológica de anticuerpos en sueros humanos, es la proteína de cubierta E1. La topología global de la proteína E1 comprende un gran ectodominio extracelular (1 a 452) que incluye una región  $\alpha$ -helicoidal (438 a 452) con un dominio transmembranal (453 a 468), seguido de un segmento corto de anclaje C-terminal (hasta 481).

35 Un motivo de la insolubilidad de E1 del RV podría ser la conformación del ectodominio, que se supone que está estabilizado por diez puentes disulfuro. El péptido E1 de la rubeola se organiza en una región aminoterminal (N-terminal) y una región carboxiterminal (C-terminal) con un contenido total de 24 residuos de cisteína.

40 En general, el extremo N-terminal se refiere al extremo de una proteína o polipéptido terminado en un aminoácido con un grupo amina (NH<sub>2</sub>) libre, mientras que el extremo C-terminal se refiere al extremo de una proteína o polipéptido terminado en un aminoácido con un grupo carboxilo libre (COOH).

Gros *et al.* (1997) dan a conocer que la región N-terminal de la proteína E1 de la rubeola contiene ocho disulfuros  
45 contruidos a partir de los residuos cisteína C(8) a C(287), mientras que la región C-terminal contiene dos disulfuros generados a partir de los residuos cisteína C(249) a C(401). Los residuos C(456), C(466) y C(468) se localizan en el segmento transmembranal predicho, y el residuo C(470) se predice que se localiza en el interior del virus. Estos datos indican que los residuos C(456) a C(470) no se encuentran implicados en la formación de disulfuro.

50 La abundancia de residuos cisteína, con la probabilidad concomitante de falsos sucesos de formación de puentes (es muy probable que se produzca la reorganización de puentes SH intramoleculares e intermoleculares) sugiere que el repliegamiento conformacional y oxidativo de E1 es un proceso extremadamente complejo que resulta difícil de controlar *in vitro*. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de un protocolo simple y fiable que facilite tanto la purificación como el repliegamiento de alto rendimiento de los antígenos de la rubeola en una conformación inmunoreactiva (es decir, antigénica). Las variantes de cubierta de E1 recombinante plegada de tipo nativo son un requisito obligatorio  
55 para conseguir un inmunoensayo fiable de anticuerpos contra el RV.

El ectodominio de E1 de la rubeola (1 a 452) contiene 20 residuos de cisteína. La correcta formación de puentes entre los mismos determina la estructura tridimensional y resulta crucial para la exposición de los epítomos conformacionales de tipo nativo correctos. El repliegamiento oxidativo de las proteínas ricas en cisteínas, que es la formación  
60 de puentes disulfuro intramoleculares y/o intermoleculares correctos, es un proceso complejo y experimentalmente exigente. Para la inserción de puentes disulfuro *in vivo* en proteínas sintetizadas *de novo* o trasladadas, se dispone de un arsenal de adyuvantes de plegamiento (chaperonas, oxidorreductasas, prolil-isomerasas) en compartimientos celulares (retículo endoplasmático en eucariotas, periplasma en células procarióticas). Debido a que el potencial redox del citosol bacteriano es fuertemente reductor (-270 mV), las cisteínas de las proteínas diana heterólogas se encuentran  
65 naturalmente en forma de grupos tiol. En el caso de que la expresión sea muy elevada, las proteínas diana se depositan en la célula huésped en forma de agregados insolubles (los denominados cuerpos de inclusión, IB).

## ES 2 356 383 T3

Habitualmente, la fracción de proteínas parcialmente plegadas y no plegadas se solubiliza bajo condiciones reductoras (por ejemplo TCEP 5 nM) en soluciones caotrópicas (GdmCl 7,0 M, urea 8,0 M), resultando en cadenas de proteína no plegadas, que deben renaturalizarse (es decir, replegarse en la conformación nativa o de tipo nativo). A modo de regla general, el rendimiento de proteínas plegadas de tipo nativo resulta fuertemente reducido por los puentes disulfuro incorrectos.

Con independencia de los aspectos conformacionales, incluso un número limitado de cisteínas (y considerando que los sucesos de formación de puentes son estrictamente intramoleculares) rinde un número enorme de sucesos erróneos de formación de puente, llevando a reacciones secundarias improductivas tales como procesos de agregación. A diferencia del repliegamiento *in vitro* en una probeta, un enorme arsenal de adyuvantes de plegamiento en un ambiente redox optimizado como ayuda al plegamiento se encuentra disponible para el plegamiento *de novo in vivo*. Sin embargo, la expresión soluble de proteínas ricas en cisteínas funcionales en células huésped procarióticas como *E. coli* es todavía muy compleja. El objetivo de incrementar la tasa de sobreproducción de antígenos inmunorreactivos de RV y de incrementar la solubilidad de las proteínas plegadas se ha conseguido sólo en un grado limitado.

En Newcombe *et al.*, 1994, se utilizaron nueve proteínas de fusión E1-glutatió-S-transferasa (GST) para expresar fragmentos de antígeno E1 de rubeola en *E. coli* en una forma soluble. Únicamente tras un truncado sustancial de la secuencia de E1 resultó posible una expresión soluble con éxito para la región libre de cisteínas 243 a 286 (44 residuos aminoácidos). la patente EP n° 0299673 da a conocer un péptido entre los residuos aminoácidos 207 a 353 que conserva las características de unión específica de Ig de la rubeola.

Además, Starkey *et al.* (1995) dan a conocer que únicamente un área muy estrecha de 44 a 75 residuos aminoácidos de la proteína de fusión GST-E1 era soluble. Las proteínas de fusión de GST que contienen la secuencia codificante completa de E1 y subfragmentos más grandes se expresaron en formas que no pudieron purificarse y que, por lo tanto, se supuso que se expresaban en forma de cuerpos de inclusión insolubles.

Con el fin de identificar los determinantes inmunorreactivos en los antígenos del RV, los epítomos E1 y E2 han sido mapeados extensivamente en los últimos años mediante la utilización de péptidos sintéticos (Mitchell *et al.*, 1993). Además, se han localizado epítomos independientes claros dentro de la proteína E1 del RV, incluyendo dominios que resultan importantes para la infectividad vírica y la hemoaglutinación (Waxham y Wolinsky, 1985; Green y Dorsett, 1986; Ho-Terry *et al.*, 1985). Las fusiones recombinantes de proteína A-E1 descritas por Terry *et al.* (1989) caracterizan únicamente epítomos lineales. La localización más detallada de los epítomos de la glucoproteína E1 del RV ha sido descrita por Terry *et al.* (1988), Wolinsky *et al.* (1991) y Chaye *et al.* (1993). Además, Gießauf *et al.* (2004) evalúan una ELISA mediante la utilización de varios péptidos recubiertos de E1 para mejorar la determinación de la inmunidad frente a la rubeola. Únicamente uno de estos péptidos, el péptido BCH-178, aparentemente podía cribar anticuerpos neutralizadores como método adicional para confirmar títulos de HAI bajos positivos o límite o valores de IgG de RV. No existe ninguna otra prueba de que el péptido de pequeño tamaño BCH-178 (residuos aminoácidos 213 a 239) contenga la mayoría de los epítomos antigénicos de la molécula E1 nativa. Sin embargo, hasta ahora no se ha hecho referencia a la localización de la reactividad principal de la proteína de cubierta E1 inmunodominante de la rubeola.

El objetivo de la presente invención es proporcionar una variante soluble de E1 de la rubeola procedente de sistemas celulares procarióticos, que aúne una elevada solubilidad y una reactividad inmunológica elevada en un ensayo serológico.

### Descripción resumida de la invención

El objetivo de la presente invención es un antígeno soluble de E1 de rubeola y variantes de este péptido caracterizadas porque no presentan en el extremo C-terminal por lo menos la región transmembranal y el segmento de anclaje, así como por lo menos los aminoácidos 143 a 168 y que contenga por lo menos la región que comprende los puentes disulfuro Cys349-Cys352 y Cys368-401 y que comprende por lo menos los aminoácidos 315 a 412 de la secuencia de E1 de rubeola, en el que el antígeno de E1 de rubeola se encuentra fusionado con una chaperona FKBP.

El antígeno E1 de rubeola soluble se caracteriza además porque no presenta adicionalmente en el extremo C-terminal la región  $\alpha$ -helicoidal entre los residuos aminoácidos 438 y 452.

Además, el antígeno E1 de rubeola soluble se caracteriza porque la región N-terminal contiene por lo menos la región que comprende los puentes disulfuro Cys8-Cys13 y Cys59-Cys71, más preferentemente la combinación de puentes disulfuro Cys8-Cys13 y Cys59-Cys71 y Cys117-Cys130.

Además, el antígeno E1 de rubeola soluble se caracteriza porque la región C-terminal contiene por lo menos la región que comprende los puentes disulfuro Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, más preferentemente la combinación de puentes disulfuro Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, o la combinación de los puentes disulfuro Cys176-Cys185, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, más preferentemente la combinación de los puentes disulfuro Cys175-Cys185, Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401.

## ES 2 356 383 T3

Además, la invención se refiere a una molécula de ADN recombinante, codificante de un antígeno E1 de rubeola y variantes, que se expresa recombinantemente como proteína de fusión chaperona, plegada en una conformación soluble e inmunorreactiva y que se utiliza además para la detección serológica de anticuerpos anti-rubeola.

5 La presente invención da a conocer un método para la detección, determinación y cuantificación de anticuerpos anti-rubeola de la subclase IgG y/o IgM en una muestra en la que el antígeno E1 de rubeola se utiliza como reactivo de captura y/o pareja de unión para los anticuerpos. La invención comprende además un ensayo diagnóstico y un kit de reactivos para la detección de anticuerpos anti-rubeola, que contiene por lo menos un antígeno de los antígenos de E1 de rubeola.

10

### Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 muestra un espectro de UV de la proteína de fusión SS-E1 (201 a 431) tras el plegamiento asistido por matriz y elución en gradiente de imidazol. El espectro se registró en un fotómetro Uvicon XS utilizando una longitud de camino óptico de 1 cm. Las condiciones del tampón eran fosfato sódico 50 mM, pH 8,0, cloruro sódico 100 mM e imidazol 250 mM. Utilizando un coeficiente de extinción molar  $\epsilon$  de  $48.370 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para SS-E1 (201 a 432), se determinó que la concentración de proteínas era de  $7,25 \mu\text{M}$ . La forma del espectro refleja la solubilidad del fragmento de ectodominio de E1 de rubeola (201 a 432) con chaperona (ver también el Ejemplo 3a).

20 La figura 2 muestra una purificación de SS-E1 (201 a 432) documentada por SDS-PAGE. El gel con tinción de Coomassie muestra (de izquierda a derecha) el estándar de proteína M 12 de Invitrogen (carril 1), el extracto crudo caotrópico de *E. coli* (fracción insoluble: carril 2, fracción soluble: carril 3), el eluido de IMAC (carril 5), la fracción de lavado que contiene contaminación prominente con una masa molecular aparente de  $\sim 50 \text{ kDa}$  (carril 7) y las fracciones de elución con imidazol de SS-E1 (201 a 432) (carriles 9 a 11). La pureza de la proteína de fusión superaba el 95% según el SDS-PAGE. No existía indicación de compuestos de SS de disulfuros mixtos o intermoleculares covalentes. Esto apunta a la formación cuantitativa de puentes de las cisteínas 349 y 352 y de las cisteínas 368 y 401, respectivamente (ver también el Ejemplo 3b).

30 La figura 3 muestra que todas las variantes de cisteína de SS-E1 (201 a 432) forman dímeros solubles según evaluación mediante análisis FPLC. Las variantes sin cisteínas y con puentes disulfuro de SS-E1 (201 a 432) se analizaron en una columna de filtración en gel analítica Superdex 200 HR 10/30 y se evaluaron para su estado oligomérico. El tampón de corrido era fosfato sódico 50 mM, pH 7,8, cloruro sódico 100 mM, EDTA 1 mM; la carga de proteínas era de  $200 \mu\text{g}$ . Se realizó un seguimiento de la elución mediante absorción a 280 nm. El SS-E1 sin cisteínas más extendido (201 a 432) eluía a 12,6 ml (línea gris oscuro continua), mientras que las variantes más compactas de doble puente disulfuro (línea negra continua) y triple puente disulfuro (línea negra discontinua) eluyeron ambas en 12,9 ml. El estándar de proteína de HPLC de Roche (línea gris pálido discontinua) incluía  $\beta$ -galactosidasa (465 kDa), IgG (150 kDa), Fab (50 kDa), mioglobina (17 kDa) y el dipéptido Gly-Tyr (238 Da) (ver también el Ejemplo 3c).

40 La Tabla muestra la detección de anticuerpos Ig anti-rubeola en sueros nativos mediante la utilización de antígeno SS-E1 de rubeola (aminoácidos 201 a 432). Se concluyó que todos los sueros clasificados como positivos eran correctos. Además, los resultados revelaron una separación clara entre muestras positivas ( $\text{COI}^* \geq 1$ ) y negativas ( $\text{COI}^* < 1$ ) (ver también el Ejemplo 6).

### Descripción adicional de las tablas

45

La expresión “valor de corte” es una señal para discriminar entre los resultados positivos y negativos, es decir, “señal  $\geq$  valor de corte” es una definición para las muestras positivas; “señal  $<$  valor de corte” es una definición para las muestras negativas. El término “COI” se define como el índice de valor de corte. El COI se calcula como señal de la muestra/señal en el valor de corte, es decir,  $\text{COI} \geq 1$  para las muestras positivas y  $\text{COI} < 1$  para las muestras negativas.

50

### Descripción detallada de la invención

55 La invención da a conocer un antígeno E1 de rubeola soluble y variantes de este péptido caracterizadas porque no presentan en el extremo C-terminal por lo menos la región transmembranal y el segmento de anclaje, así como por lo menos los aminoácidos 143 a 168 y que contiene por lo menos la región que comprende los puentes disulfuro Cys349-Cys352 y Cys368 a 401 y que comprende por lo menos los aminoácidos 315 a 412 de la secuencia de E1 de la rubeola, en la que el antígeno de E1 de la rubeola se fusiona con una chaperona FKBP.

60 La definición anteriormente indicada de los aminoácidos que resultan necesarios como requisito mínimo del antígeno E1 de rubeola no son absoluto y pueden verificarse fácilmente mediante experimentos realizados por un experto ordinario en la materia.

El antígeno E1 de rubeola soluble y variantes de este péptido preferentemente no presentan los aminoácidos 143 a 168. La definición anteriormente proporcionada de los límites no es absoluta; el número de residuos aminoácidos no presentes dentro de esta región es variable.

65

Además, la presente invención se refiere también a un antígeno E1 de rubeola recombinante soluble y variantes de este péptido que no presentan además la región  $\alpha$ -helicoidal entre los residuos aminoácidos 438 y 452.

## ES 2 356 383 T3

Para evaluar si resulta posible reducir la complejidad del repliegamiento oxidativo y conformacional de la proteína E1 de rubeola mediante sustitución de determinados residuos de cisteína y la eliminación de determinadas secuencias con segmentos extremadamente hidrofóbicos se llevó a cabo un análisis de delección.

5 Según la presente invención, la expresión “puente disulfuro” se refiere a dos residuos cisteína que son contiguos en la estructura tridimensional de una proteína y que pueden oxidarse para formar un enlace disulfuro (Freedman, Curr. Op. Struct. Biol. 5:85-91, 1995; Creighton *et al.*, TIBTECH 13:18-23, 1995; Raina, Annu. Rev. Microbiol. 51:179-202, 1997). La tasa de formación de enlaces disulfuro depende de la proximidad entre los dos residuos de cisteína, definida como la probabilidad de que sus átomos de azufre se acerquen a la distancia necesaria para el intercambio tiol/disulfuro. Los enlaces disulfuro, también denominados puentes disulfuro (son sinónimos, enlaces SS y puentes SS, respectivamente), constituyen contactos terciarios covalentes y habitualmente contribuyen a la estabilización de la conformación plegada. La estabilización resulta de restringir la flexibilidad conformacional de una cadena polipeptídica no plegada, es decir, la contribución de los enlaces SS a la estabilidad de una proteína es entrópica y no entálpica de modo natural. La formación de enlaces disulfuro requiere un ambiente oxidante. Por lo tanto, las proteínas intracelulares prácticamente no contienen puentes disulfuro debido a que los compartimientos intracelulares, tales como el citoplasma bacteriano o el citosol eucariótico, son esencialmente reductores. Sin embargo, los puentes disulfuro se producen con frecuencia en proteínas secretadas o traslocadas, tales como los ectodominios gp41 y gp36 de VIH-1 y VIH-2, respectivamente, y en las proteínas de cubierta E1 y E2 de rubeola.

20 Inesperadamente, se ha encontrado que se obtiene una variante soluble del antígeno E1 de rubeola mediante delección de la región transmembranal y del segmento de anclaje C-terminal, preferentemente entre los residuos aminoácidos 453 y 481. Más preferentemente, también se deleciona la región  $\alpha$ -helicoidal entre los residuos 453 y aproximadamente 468. También se da a conocer que, dentro de la región N-terminal, también deben deleccionarse los residuos aminoácidos 143 a 164, más preferentemente entre el aminoácido 134 y aproximadamente 168.

25 La combinación de los puentes disulfuro Cys8-Cys13, Cys59-Cys71, Cys117-Cys130, y los puentes disulfuro Cys176-Cys185, Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, respectivamente, en la que la región transmembranal y el segmento de anclaje C-terminal, así como por lo menos los aminoácidos 143 a 168, rinde el antígeno E1 de rubeola más extendido según la presente invención que todavía es soluble y que contiene el máximo número posible de epítomos con una reactividad inmunológica alta preferible en un ensayo serológico.

30 La región N-terminal en la proteína de cubierta E1 de rubeola y variantes de la misma según la presente invención contiene preferentemente por lo menos la región que comprende los puentes disulfuro Cys8-Cys 13 y Cys 59-Cys71, más preferentemente la combinación de puentes disulfuro Cys8-Cys13 y Cys59-Cys71 y Cys117-Cys130. La combinación de puentes disulfuro Cys8-Cys13 y Cys59-Cys71 y Cys117-Cys130 presenta un efecto beneficioso sobre el fragmento de E1 de rubeola según la presente invención debido a que garantiza la fijación terciaria de determinados epítomos de E1 de rubeola con un antígeno de elevada reactividad inmunológica.

35 La región C-terminal en el antígeno E1 de rubeola y variantes del mismo según la presente invención contiene por lo menos la región que comprende los puentes disulfuro Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, más preferentemente la combinación de puentes disulfuro Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, o la combinación de los puentes disulfuro Cys176-Cys185, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, más preferentemente la combinación de puentes disulfuro Cys175-Cys185, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, más preferentemente la combinación de puentes disulfuro Cys176-Cys185, Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401. La combinación de los puentes disulfuro Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, o la combinación de los puentes disulfuro Cys176-Cys185, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401 presenta un efecto adicional sobre el antígeno E1 de rubeola debido a que permite la accesibilidad de los epítomos principales con una reactividad inmunológica elevada.

40 Para la determinación de la inmunorreactividad principal del antígeno E1 de rubeola, en primer lugar la proteína se dividió para los propósitos de los presentes inventores en una parte N-terminal que comprendía los residuos aminoácidos 1 a 314 y una parte C-terminal que comprendía los residuos aminoácidos 315 a 432. Las secuencias de ambas partes se diseñaron sin cisteínas para evitar artefactos de repliegamiento debido a la reorganización de disulfuros y se clonaron adicionalmente en vectores de expresión. A continuación, se insertó cada puente disulfuro adicional del péptido E1 de rubeola tal como describen Gros *et al.* (1997) en la parte N-terminal y C-terminal individualmente y en combinación. Se evaluó la importancia de los contactos terciarios covalentes para la fijación de epítomos a partir de la reactividad inmunológica respectiva.

45 Cabe indicar que resultó evidente a partir del análisis de filtración en gel que el fragmento N-terminal (1 a 314) aparecía como un asociación molecular de alto peso molecular, mientras que el fragmento C-terminal (315 a 432) aparentemente eluyó en forma de dímero. Esto contrasta con el estado de la técnica descrito en Baron y Forsell (1991), que da a conocer los péptidos E1/E2 de rubeola como un conglomerado que consiste de monómeros, homodímeros y heterodímeros. Los resultados de la presente invención revelaron además que las diferentes características de solubilidad se correlacionan con la actividad de expresión: mientras que la tasa de producción del segmento N-terminal (1 a 314) sólo era de aproximadamente 1 mg de proteína/gramo de biomasa, la tasa de producción del segmento C-terminal (315 a 432) excedía inesperadamente 20 mg de proteína/gramo de peso celular húmedo.

50 Las variantes sin cisteínas no mostraron una reactividad inmunológica significativa al evaluarlas con sueros positivos para rubeola en un analizador automático Elecsys<sup>®</sup>. Resulta importante que los puentes disulfuro individuales

## ES 2 356 383 T3

o la combinación de puentes disulfuro dentro del fragmento N-terminal (1 a 314) no mostraron un incremento significativo de la reactividad. Sin embargo, la reactividad del fragmento C-terminal (residuos aminoácidos 315 a 432) se incrementó significativamente al insertar los puentes disulfuro Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401. El motivo para la falta de reactividad de la proteína E1 N-terminal de rubeola podría deberse a un elemento estructural dentro de la secuencia que media en la agregación o asociación y que de esta manera compromete la accesibilidad de los epítomos principales.

Con el fin de demostrar adicionalmente dicha suposición, el fragmento N-terminal (residuos aminoácidos 1 a 314) de la proteína de cubierta E1 de rubeola se truncó en etapas desde su extremo C-terminal. De manera similar, se extendió gradualmente el fragmento C-terminal (315 a 432) en su extremo N-terminal. Se esperaba que el fragmento C-terminal sería insoluble al alcanzar un determinado grado de extensión, mientras que el fragmento N-terminal se convertiría en soluble en un grado determinado de truncado.

Para la expresión y caracterización de las variantes C-terminales, se utilizó E1-C(aminoácidos 260 a 432), E1-C(aminoácidos 201 a 432), E1-C(aminoácidos 143 a 432), E1(aminoácidos 56 a 432) y E1(aminoácidos 34 a 432). Las variantes E1(aminoácidos 201 a 432), E1(aminoácidos 260 a 432) y E1(aminoácidos 315 a 432) forman dímeros estables, mientras que los constructos más largos presentaban una tendencia extrema a la agregación o asociación. De esta manera, el motivo de oligomerización del ectodominio de E1 se encontraba confinado a una región entre aproximadamente el aminoácido 143 y aproximadamente el aminoácido 200. Para un mapeado más preciso, el fragmento E1 (169 a 432) e clonó, se expresó y se caracterizó. Inesperadamente, este constructo formaba dímeros tanto estables como solubles y por lo tanto era un buen candidato para la detección de moléculas de Ig anti-rubeola. Basándose en este resultado, pudo confirmarse el motivo de asociación al segmento entre los aminoácidos 143 y 168. Para un mapeado más detallado, se caracterizaron los fragmentos E1 (146 a 432) y E1 (163 a 432). Ambos constructos eluyeron parcialmente en forma de dímeros, parcialmente en forma de agregados de elevado peso molecular y por lo tanto eran de valor limitado como antígenos para la detección de anticuerpos Ig anti-rubeola en un formato de sándwich de doble antígeno en una etapa.

Como resultado principal de esta serie de ensayos de la presente invención pudo demostrarse claramente que resulta posible extender el fragmento C-terminal de E1 (315 a 432) del residuo aminoácido 315 hasta el residuo aminoácido 169 sin comprometer la solubilidad, el estado de oligomerización y la estabilidad.

En segundo lugar, la región entre el primer y el segundo tercios del ectodominio de E1 (143 a 168) contiene un motivo estructural o de secuencia que es responsable de la asociación de la proteína para formar agregados de elevado peso molecular. La hidrofobicidad inherente de esta región resulta inesperada debido a que no puede deducirse a partir de un análisis simple de la estructura primaria. La región que comprende el motivo de asociación restringe marcadamente la utilización de la proteína de cubierta E1 para la detección serológica de moléculas de IgG.

Se utilizó un procedimiento comparable para la optimización de la solubilidad del fragmento N-terminal. Los fragmentos de E1, E1-N (1 a 200), E1-N (1 a 142), E1-N (1 a 104) y E1-N (1 a 55) se clonaron en vectores de expresión, se transfirieron a células huésped de *E. coli*, se expresaron y se caracterizaron. Tal como se esperaba, el fragmento N-terminal más largo (ectodominio 1 a 200) eluyó en forma de un agregado de elevado peso molecular y de esta manera era muy similar a la variante E1-N (1 a 314) de ectodominio de E1. Se consiguieron propiedades de solubilidad significativamente mejoradas con el fragmento truncado E1-N (1 a 142), que eluía parcialmente como dímero soluble y parcialmente como un agregado de elevado peso molecular. Finalmente, las variantes truncadas E1-N (1 a 104) y E1-N (1 a 55) aparentemente eluyeron en forma de dímeros. La región entre los residuos aminoácidos 104 y 142 se analizó adicionalmente mediante la utilización de los fragmentos E1-N (1 a 117) y (1 a 133). Ambas variantes aparecieron como dímeros solubles en el análisis de FPLC y de esta manera satisfacen un importante prerrequisito para la detección serológica de las moléculas de IgG. sin embargo, la variante E1-N (1 a 117) era más estable y por lo tanto el mejor candidato para los experimentos adicionales de optimización.

Brevemente, se identificaron dos regiones de la proteína E1 de rubeola tras la optimización de longitud en la presente invención, que se expresan muy bien en *E. coli* y que forman dímeros solubles. El fragmento N-terminal (E1-N) que comprende los residuos aminoácidos 1 a 117/1 a 133, y el fragmento C-terminal (E1-C) que comprende la región 169 a 432/201 a 432. Mediante estos fragmentos de E1 se contestó a la cuestión de qué puentes disulfuro resultan importantes para la antigenicidad del ectodominio de E1 de rubeola recombinante. Por lo tanto, se reconstituyeron los pares de cisteínas (individualmente y en combinación) y se evaluaron las variantes de E1 correspondientes en un analizador automático Elecsys® (Roche Diagnostics GmbH) con sueros positivos para anti-rubeola.

Se caracterizaron las variantes de cisteína siguientes en E1 de rubeola (201 a 432): las variantes de un único puente Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys 401, la combinación de doble puente Cys349-Cys352/Cys368-Cys 401 y la combinación de triple puente Cys225-Cys235/Cys349-Cys352/Cys368-Cys401. Además, se analizó la doble combinación Cys176-185/Cys225-Cys235 en el constructo E1 extendido (169 a 432).

Se caracterizaron las combinaciones de cisteínas siguientes en el fragmento E1 de rubeola fragmento 1 a 133: las variantes de un único puente Cys8-Cys13, Cys59-Cys71 y Cys117-Cys130 y las combinaciones de doble puente Cys8-Cys13/Cys59-Cys71, Cys8-Cys13/Cys117-130 y Cys59-Cys71/Cys11-Cys130. Además, la combinación de doble puente Cys8-Cys13/Cys59-Cys71 se caracterizó en el constructo de fusión E1-N(1-117) y E1-N(1-104). La evaluación inmunológico de las variantes de E1 de rubeola en un analizador automático Elecsys® reveló que la anti-

## ES 2 356 383 T3

genicidad dependía de la conformación de tipo nativo de la molécula de ectodominio, que se encuentra fijada por los contactos terciarios covalentes mediada por los puentes disulfuro.

5 Inesperadamente, estos resultados diagnósticos demuestran que, en términos de inmunorreactividad, deben enfati-  
zarse de diferente manera los puentes disulfuro del antígeno E1 de rubeola. Los puentes disulfuro Cys349-Cys352, así  
como Cys368-Cys401 desempeñan un papel decisivo. El incremento de sensibilidad en combinación con estos puentes  
disulfuro interesantemente no era aditivo, sino cooperativo. La evaluación del constructo E1-C (201 a 432) demuestra  
10 señales significativas para la fijación terciaria de Cys349-Cys352, así como para Cys368-Cys401 en cada caso. Me-  
diante la combinación de ambos puentes, el nivel de señal inesperadamente se incrementó en varias veces, comparado  
con los constructos con un solo puente. Presumiblemente, una conformación de tipo nativo del ectodominio de E1 de  
rubeola se fija mediante las dos combinaciones intramoleculares, detectando una cantidad más alta de moléculas de IgG  
específicas en los sueros positivos para rubeola. La relevancia de los contactos terciarios covalentes resulta particular-  
mente evidente según la evaluación inmunológica del constructo sin cisteínas E1-C (201 a 432). Inesperadamente, no  
15 pudieron medirse señales positivas en el constructo sin cisteínas, en contraste con los constructos con un solo puente.

La detección inmunológica de anticuerpos IgG anti-rubeola en muestras nativas se mejoró adicionalmente con  
el antígeno optimizado E1-C (201 a 432, Cys349-Cys352, Cys368-Cys401). Todos los sueros humanos utilizados  
en estos estudios, clasificados como positivos para IgG anti-rubeola, se encontró que eran positivos. Mediante la  
utilización del más complejo constructo de fusión de puentes terciarios E1-C (169 a 432, Cys225-Cys235, Cys349-  
20 Cys352, Cys368-Cys401), pudieron obtenerse resultados equivalentes para la detección de los anticuerpos IgG anti-  
rubeola.

Pudieron reducirse los requisitos mínimos para un fragmento de antígeno E1 de rubeola a un esqueleto polipeptí-  
dico conectado intramolecularmente mediante por lo menos los puentes disulfuro Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401.  
25 Debido a que el fragmento de E1 llamado E1-C (342 a 412, Cys349-Cys352, Cys368-Cys401) muestra una reactivi-  
dad inmunológica insuficiente, se consideró que los elementos de secuencia contiguos al extremo N-terminal y/o  
al extremo C-terminal de E1-C (342 a 412) eran importantes para la reactividad inmunológica. Para demostrarlo, se  
clonó y se caracterizó este constructo, E1-C (315 a 412, Cys349-Cys352, Cys368-Cys401). Para este fragmento pudo  
demostrarse una reactividad inmunológica que era comparable a la de E1-C (201 a 432, Cys349-Cys352, Cys368-  
30 Cys401). Este resultado demuestra que los residuos aminoácidos de la región N-terminal (315 a 342) del constructo  
E1-C (aminoácidos 315 a 412) aparentemente resultan importantes para la reactividad inmunológica del antígeno E1  
de rubeola. El experto ordinario en la materia será capaz de demostrar mediante experimentos adicionales qué elemen-  
tos de secuencia contiguos al extremo N-terminal y/o al extremo C-terminal de E1-C (315 a 412) resultan importantes  
para la reactividad inmunológica.

35 Además del fragmento altamente reactivo con puentes disulfuro de la parte C-terminal del ectodominio, se clonaron  
y se expresaron varios fragmentos N-terminales. Revelaron una reactividad inmunológica significativa. Se obtuvo  
inmunorreactividad de los constructos de fusión de doble puente E1-N (1 a 117, Cys8-Cys13/Cys59-Cys71) y E1-N  
(1 a 133, Cys8-Cys13/Cys59-Cys71).

40 El fragmento de E1 de rubeola más largo que puede replegarse en una conformación soluble e inmunorreacti-  
va comprende los residuos aminoácidos 1 a 133, comprendiendo los puentes disulfuro Cys8-Cys13 y Cys59-Cys71,  
más preferentemente los puentes disulfuro Cys8-Cys13 y Cys59-Cys71 y Cys117-Cys130, y entre los residuos ami-  
noácidos 169 a 432, comprende los puentes disulfuro Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, y la combinación de los  
45 puentes disulfuro Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, o la combinación de puentes disulfuro Cys176-  
Cys185, Cys349-Cys352, Cys368-Cys401, más preferentemente la combinación de puentes disulfuro Cys176-Cys185,  
Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401 que no presenta en el extremo C-terminal por lo menos la región  
transmembranal y el segmento de anclaje C-terminal corto, así como por lo menos los aminoácidos 143 a 164, prefe-  
rentemente los aminoácidos 134 a 168.

50 Por lo tanto, una realización preferente de la presente invención es un antígeno E1 de rubeola soluble y variantes  
de este péptido que contienen la región que comprende los puentes disulfuro Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401 y  
adicionalmente por lo menos la región que comprende el puente disulfuro Cys225-Cys235.

55 Un objeto adicional de la presente invención se refiere a un antígeno E1 de rubeola soluble y variantes de este pép-  
tido que contienen la región que comprende los puentes disulfuro Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401  
y adicionalmente por lo menos la región que comprende el puente disulfuro Cys176-Cys185. Además, la combina-  
ción de los puentes disulfuro Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, más preferentemente la combinación de los puentes  
disulfuro Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, o la combinación de los puentes disulfuro Cys176-  
60 Cys185, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, más preferentemente la combinación de los puentes disulfuro Cys176-  
Cys185, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, más preferentemente la combinación de los puentes disulfuro Cys176-  
Cys185, Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401 es una realización preferente de la presente invención.  
Estos antígenos E1 de rubeola contienen la reactividad inmunológica principal para la formación de epítomos.

65 Una realización preferente adicional de la presente invención se refiere a un antígeno E1 de rubeola soluble y  
variantes de esta proteína que además de contener los puentes disulfuro Cys176-Cys185, Cys225-Cys235, Cys349-  
Cys352 y Cys368-Cys401, contienen la región que comprende los puentes disulfuro Cys8-Cys13 y Cys59-Cys71, más  
preferentemente los puentes disulfuro Cys8-Cys13 y Cys59-Cys71 y Cys117-Cys130.



## ES 2 356 383 T3

La región del antígeno E1 de rubeola que comprende por lo menos los puentes disulfuro Cys8-Cys13 y Cys59-Cys71, más preferentemente los puentes disulfuro Cys8-Cys13 y Cys59-Cys71 y Cys117-Cys130 contienen también cierta reactividad inmunológica para la formación de epítomos. También resulta posible utilizar estos fragmentos N-terminales sin unión a las secuencias C-terminales que contienen los puentes disulfuro Cys176-Cys185, Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401. Preferentemente, estos antígenos E1 de rubeola N-terminales se utilizan en un ensayo en combinación con los antígenos E1 de rubeola C-terminales tal como se ha indicado anteriormente.

En la presente invención, se han identificado regiones y fragmentos completos del ectodominio de E1 de rubeola que se expresaron recombinantemente en *E. coli* y que se replegaron reproduciblemente *in vitro* en una conformación funcional. Los fragmentos de E1 de la presente invención optimizados con respecto a su longitud y a su rendimiento de cisteínas son solubles y en particular resultan adecuadas para la detección de IgG anti-rubeola en sueros positivos para rubeola.

Este resultado contrasta con los fragmentos de E1 de rubeola conocidos (Newcombe *et al.*, 1994; Starkey *et al.*, 1995, patente EP nº 0299673). Estos constructos conocidos no contienen la combinación de los puentes disulfuro Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401 y por lo tanto no presentan la reactividad inmunológica principal para la formación de epítomos. Además, los constructos conocidos no dan a conocer los puentes disulfuro de la región N-terminal Cys8-Cys13 y Cys59-Cys71 y Cys117-Cys130 y/o la combinación de los puentes disulfuro de la región C-terminal y de la región N-terminal en la que el extremo C-terminal no presenta pro lo menos la región transmembranal, así como por lo menos los aminoácidos 143 a 168, tal como se da a conocer en la presente invención, que puede replegarse en una conformación altamente soluble e inmunorreactiva. Además, los constructos de fusión preferentes de la presente invención pueden contener partes más largas de proteína E1 de rubeola con más epítomos debido a que son solubles y por lo tanto más adecuados para la detección de la mayor parte de los anticuerpos anti-rubeola.

El término “variantes” se refiere a secciones de secuencias de diferente longitud del ectodominio de E1 de rubeola, que pueden comprender un número diferente de parejas de cisteínas. Estas secuencias, la secuencia de ácidos nucleicos del casete insertado y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión resultante de E1 de rubeola, se describe en el protocolo de secuencias de la presente invención.

Además, el término “variantes” en el presente contexto se relaciona con una proteína sustancialmente similar a dicha proteína. En particular, una variante puede ser una isoforma o alelo que muestra intercambios, deleciones o inserciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la isoforma de proteína más prevalente. Preferentemente, dicha proteína sustancialmente similar presenta una similitud de secuencias respecto a la isoforma más prevalente de la proteína de por lo menos 80%, preferentemente de por lo menos 85%, más preferentemente de por lo menos 85%, todavía más preferentemente de por lo menos 95%.

El término “variante” también se refiere a una proteína modificada post-traduccionalmente, tal como una proteína glucosilada. Una “variante” también es una proteína que ha sido modificada tras recoger la muestra, por ejemplo mediante unión covalente o no covalente de un marcaje, particularmente un marcaje fluorescente radioactivo, a la proteína. Otros posibles marcajes son radioactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes, electroquimioluminiscentes, enzimas u otros. Son “variantes” adicionales los grupos de unión a una fase sólida como, por ejemplo, proteínas biotiniladas; se da a conocer una descripción detallada de los marcajes en las páginas 24 y 25 de la presente invención.

También se describe que el antígeno E1 de rubeola puede producirse mediante síntesis química; la síntesis puede llevarse a cabo en solución homogénea o en fase sólida. Por ejemplo, la técnica de síntesis en solución homogénea que puede utilizarse es la descrita para Houbenweyl (1974). La proteína de la invención también puede prepararse en fase sólida según los métodos descritos por Atheton y Shepard (1989).

Las proteínas E1 de rubeola anteriormente indicadas, optimizadas para su solubilidad y un estado monomérico u oligomérico definido, también ofrecen el potencial de ser módulos de detección de IgM. Para este fin, las proteínas de fusión de E1 que resultan evidentes como dímeros podrían polimerizarse, por ejemplo mediante entrecruzamiento químico. Una realización preferente adicional de la presente invención es un polímero mixto compuesto de las proteínas E1 y E2 y proteína nuclear C. Las proteínas E2 y nuclear de rubeola son conocidas de la técnica.

La proteína E1 de rubeola según la presente invención también puede prepararse por medio de técnicas de ADN recombinante. La expresión “molécula de ADN recombinante” se refiere a una molécula que se prepara mediante la combinación de dos segmentos de secuencia de otro modo separados que se consigue mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de polinucleótidos mediante técnicas de manipulación genética o mediante síntesis química. De esta manera puede unirse entre sí segmentos polinucleótidos de funciones deseadas para genera una combinación deseada de funciones.

Pueden producirse grandes cantidades de los polinucleótidos mediante replicación en una célula huésped adecuada. Los fragmentos de ADN naturales o sintéticos codificantes de proteínas o fragmentos de las mismas se incorporan en constructos de polinucleótidos recombinantes, típicamente constructos de ADN, capaces de introducción y replicación en una célula procariótica o eucariótica inferior o superior, tales como las indicadas por Sambrook *et al.* (1989). La expresión “eucariotas inferiores” se refiere a células huésped tales como levaduras, hongos y similares. Los eucariotas inferiores son generalmente (aunque no necesariamente) unicelulares. El término “procariotas” se refiere a huésped tales como *E. coli*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Bacillus subtilis* o *Streptomyces*. Estos

huéspedes también se encuentran contemplados dentro de la presente invención. Son eucariotas inferiores preferentes las levaduras, particularmente especies de *Schizosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Kluiveromyces*, *Pichia* (por ejemplo *Pichia pastoris*), *Hansenula* (por ejemplo *Hansenula polymorpha*), *Schwaniomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces* y similares. Los huéspedes levadura utilizados más comúnmente son *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis* y *K. lactis* y convenientemente son huéspedes fúngicos. La expresión “eucariotas superiores” se refiere a células huésped derivadas de animales, tales como mamíferos, reptiles, insectos y similares. Las células huésped de eucariota superior actualmente preferentes se derivan de hámster chino (por ejemplo CHO), mono (por ejemplo células COS y Vero), células renales de hámster neonato (BHK), riñón porcino (PK15), células renales 13 de conejo (RK13), la línea celular 143B de osteosarcoma humano, la línea celular humana HeLa y líneas celulares de hepatoma humano como HepG2 y las líneas de células de insecto (por ejemplo de *Spodoptera frugiperda*). Las células huésped pueden proporcionarse en suspensión o en cultivos en matraz, cultivos de tejido, cultivos de órgano y similares.

En una realización preferente según la invención, el antígeno E1 de rubeola se produce en forma de proteína de fusión recombinante. La expresión “proteína de fusión” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una proteína que comprende por lo menos un dominio de proteína correspondiente a una proteína E1 de rubeola y a por lo menos un dominio de proteína correspondiente a otra proteína de fusión preferible a la chaperona FKBP utilizado como herramienta de expresión tal como se indica posteriormente.

Otras proteínas de fusión utilizadas extensivamente son, por ejemplo, el sistema de proteína de fusión de glutatión S-transferasa (GST) para una expresión de nivel elevado y la rápida purificación de proteínas de fusión a partir de lisados celulares bacterianos y eucarióticos.

El plegamiento y purificación de las proteínas con frecuencia se facilita mediante la fusión de las mismas covalentemente con etiquetas o proteínas de pareja que se pliegan robustamente por sí solas. Entre estos módulos de fusión se incluyen proteína de unión a maltosa, glutatión S-transferasa, tiorredoxina, NuSA, DsbA y FkpA. Su utilización habitualmente presenta el objetivo de incrementar la expresión soluble (es decir, el plegamiento de tipo nativo) de la proteína diana respectiva en el citosol o en el periplasma del huésped *E. coli* sobreproductor. Las chaperonas desempeñan un papel crecientemente importante en la producción biotecnológica de proteínas solubles y funcionales. Preferentemente, las chaperonas preferentemente se utilizan como proteínas de fusión en el polipéptido de fusión de E1 de rubeola.

Las chaperonas, conocidas como “adyuvantes de plegamiento” clásicos, son proteínas que ayudan al plegamiento y mantenimiento de la integridad estructural de otras proteínas. Presentan la capacidad de estimular el plegamiento de una proteína tanto *in vivo* como *in vitro*. Generalmente, los adyuvantes de plegamiento se subdividen en catalizadores de plegamiento y chaperonas. Los catalizadores de plegamiento aceleran las etapas limitantes de tasa en el plegamiento de las proteínas en virtud de su función catalítica. Las chaperonas es conocido que se unen a proteínas desnaturalizadas o parcialmente desnaturalizadas y de esta manera ayudan a renaturalizar las proteínas. De esta manera, al contrario que los catalizadores de plegamiento, las chaperonas ejercen una mera función de unión (Buchner, 1996). Se describe en detalle ejemplos de catalizadores y chaperonas en la patente WO n° 03/000877.

Hasta hoy, se conocen varias familias diferentes de chaperonas. Todas estas chaperonas se caracterizan por su capacidad de unir proteínas no plegadas o parcialmente no plegadas y presentan una función fisiológica que se relaciona con el plegamiento correcto de las proteínas o con la eliminación de las proteínas desnaturalizadas o agregadas. Además, se ha demostrado en la patente WO n° 94/08012 que una expresión incrementada de las chaperonas podría facilitar la producción recombinante de una proteína. También es conocido que una producción incrementada de proteínas puede conseguirse mediante la utilización de un constructo génico que comprende una secuencia codificante de proteína, así como una secuencia de chaperona. El enfoque de utilizar chaperonas para la producción incrementada de proteínas plegadas de tipo nativo principalmente se debe a la función de unión y de esta manera solubilizadora de las proteínas chaperonas. Tras la producción recombinante de una proteína de fusión que comprende proteína chaperona y diana, las chaperonas habitualmente se cortan y separan de la proteína resultante, rindiendo la proteína deseada en forma pura.

Se ha demostrado en la patente WO n° 03/000877 que los adyuvantes de plegamiento, por ejemplo muchos miembros de la clase de la peptidil-propil-isomerasa (PPI), especialmente de la familia de la FKBP, no sólo muestran actividad catalítica, sino que también producen efectos beneficiosos drásticos sobre la solubilidad de las proteínas que tienden a la agregación. Lo anterior lo llevan a cabo mediante la formación de complejos solubles con dichas proteínas, que de otro modo (es decir, en una forma aislada sin chaperona) tienden a la agregación. Dichas proteínas, que de otro modo serían poco solubles o insolubles bajo condiciones fisiológicas resultan ser solubles bajo condiciones fisiológicas suaves (es decir, sin necesidad de aditivos solubilizadores tales como detergentes o agentes caotrópicos) tras unirse en un complejo con la chaperona PPI apropiada.

Los presentes inventores encontraron que la proteína de fusión producida recombinantemente según la presente invención puede obtenerse fácilmente a partir de cuerpos de inclusión en forma soluble. Una característica inesperada de la proteína E1 de rubeola comprendida en una proteína E1 de rubeola producida recombinantemente es su solubilidad bajo condiciones de tampón fisiológico. Además, la proteína E1 de rubeola según la presente invención comprendida en una proteína de fusión puede obtenerse fácilmente en una estructura de tipo nativo.

## ES 2 356 383 T3

La proteína de fusión E1 de rubeola según la presente invención también es muy fácil de manipular, por ejemplo resulta bastante fácil de renaturalizar dicha proteína de fusión. Resulta interesante que el material caotrópico puede replegarse de diferentes modos, resultando todos en una forma de tipo nativo soluble y termodinámicamente estable. El replegamiento se consigue a un rendimiento elevado, tanto mediante diálisis como mediante dilución rápida, así como mediante cromatografía de exclusión de tamaños renaturalizante o replegamiento asistido por matriz. Estos resultados sugieren que, en esta forma unida covalentemente, la proteína de fusión de antígeno de E1 de rubeola es una proteína termodinámicamente estable y no metaestable.

Preferentemente, puede producirse una proteína soluble según la presente invención mediante fusión de un antígeno de E1 de rubeola con una chaperona de clase peptidil-prolil-isomerasa. Por lo tanto, una realización preferente según la invención se refiere a la fusión de un antígeno de E1 de rubeola con una chaperona de clase peptidil-prolil-isomerasa.

Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a una molécula de ADN recombinante codificante de un antígeno E1 de rubeola, que comprende por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un antígeno E1 de rubeola, en la que cadena arriba de la misma se encuentra por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de una chaperona FKBP.

Las prolil-isomerasas pueden comprender diferentes subunidades o módulos de diferente función, por ejemplo un módulo que muestra actividad catalítica y un módulo que muestra la actividad de chaperona o unión. Dichos miembros modulares de la familia de FKBP son FkpA (Ramm, 2000), SlyD (Hottenrott *et al.*, 1997) y factor trigger (Scholz *et al.*, 1997). En una realización preferente, la invención se refiere a una molécula de ADN recombinante, caracterizada porque la chaperona FKBP se selecciona de entre el grupo que consiste de FkpA, SlyD y factor trigger.

También es bien conocido y apreciado que no resulta necesario utilizar en todos los casos la secuencia completa de una chaperona molecular. También pueden utilizarse fragmentos funcionales de chaperonas (denominados módulos) que todavía presentan las capacidad y funciones requeridas (ver la patente WO n° 98/13496).

La FkpA utilizada como herramienta de expresión según la presente invención no presenta la secuencia de señal N-terminal. Un pariente cercano de FkpA, es decir SlyD, consiste de un dominio N-terminal estructural responsable de las funciones catalíticas y de chaperona y de un extremo C-terminal mayoritariamente no estructurado que es excepcionalmente rico en residuos histidina y cisteína (Hottenrott, 1997). La patente WO n° 03/000878 da a conocer que una variante truncada C-terminalmente de SlyD que comprende los aminoácidos 1 a 165 ejerce efectos excepcionalmente positivos sobre la expresión eficiente de las proteínas diana. Al contrario que en SlyD de tipo salvaje, el peligro de comprometer la reorganización de disulfuros se evita con éxito en la variante truncada de SlyD (1 a 165) utilizada. Una molécula de ADN recombinante que comprende un SlyD truncado (1 a 165) representa una realización preferente de la presente invención.

En un modo preferente de diseño de un antígeno E1 de rubeola según la presente invención no se incluyen péptidos de señal. Los sistemas de expresión según la presente invención se ha encontrado que resultan más ventajosos en el caso de que funcionan como sistema de expresión citosólica. Esta expresión citosólica resulta en la formación de cuerpos de inclusión. A diferencia de los problemas pronunciados y bien conocidos habitualmente asociados a los cuerpos de inclusión, los presentes inventores ahora han encontrado que no sólo se produce una cantidad excepcionalmente elevada de proteína E1 de rubeola, sino que la proteína E1 de rubeola recombinante según la presente invención también resulta fácil de manipular, por ejemplo fácil de solubilizar y de replegar.

Preferentemente, la molécula de ADN recombinante de la presente invención se caracteriza además porque comprende por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un conector peptídico de 10 a 100 aminoácidos situado entre dicha secuencia codificante de un antígeno E1 de rubeola y dicha secuencia codificante de la chaperona FKBP. Tal como apreciará el experto en la materia, dicho polipéptido conector se diseña según resulte más apropiado para la aplicación pretendida, especialmente en términos de longitud, flexibilidad, carga e hidrofiliidad. Además, dicha secuencia de ADN codificante de un línker además de proporcionar, por ejemplo, un sitio de corte proteolítico, también puede actuar como polilínker, es decir, puede proporcionar múltiples sitios de restricción de ADN para facilitar la fusión de los fragmentos de ADN codificantes de una proteína E1 de rubeola y un dominio de chaperona. Tras la expresión y la purificación de la proteína de fusión obtenida y replegamiento adicional en una conformación soluble e inmunorreactiva, el polilínker facilita también la liberación de la proteína E1 de rubeola respecto del complejo de proteína de fusión.

De esta manera, un antígeno E1 de rubeola soluble y variantes de esta proteína según la presente invención pueden extraerse del constructo de fusión en el que el antígeno E1 de rubeola se caracteriza porque no presenta en el extremo C-terminal por lo menos la región transmembranal y el segmento de anclaje, así como por lo menos los aminoácidos 143 a 168 y que contiene por lo menos la región que comprende los puentes disulfuro Cys349-Cys352 y Cys368-401 y que comprende por lo menos los aminoácidos 315 a 412 de la secuencia E1 de rubeola, en la que el antígeno E1 de rubeola se fusiona con una chaperona FKBP.

Un objetivo adicional de la invención se refiere a un ADN recombinante que comprende una única secuencia de nucleótidos codificante de una chaperona FKBP y una única secuencia de nucleótidos codificante de una proteína E1 de rubeola.

Una proteína de fusión que comprende por lo menos dos dominios de chaperona FKBP y un dominio de proteína diana también resulta muy ventajosa. En una realización preferente adicional, la molécula de ADN recombinante según la presente invención comprende dos secuencias codificantes de una chaperona FKBP y una secuencia codificante de una proteína E1 de rubeola. Scholz *et al.* (2005) demuestra que la solubilidad de una proteína de fusión mejora marcadamente al fusionar una segunda unidad de chaperona. Existe evidencia que sugiere que la PPIasa naturalmente dimérica resulta estrechamente imitada por la fusión de dos dominios de chaperona FKBP, resultando en la solubilidad mejorada.

Tal como apreciará el experto en la materia, la expresión “por lo menos dos” se utiliza para indicar que dos o más secuencias de nucleótidos codificantes de un dominio de chaperona FKBP pueden utilizarse en la construcción de una molécula de ADN recombinante sin apartarse del alcance de la presente invención. Preferentemente, la proteína chaperona de E1 de rubeola contiene por lo menos dos, y como máximo cuatro, secuencias codificantes de una chaperona.

La molécula de ADN puede diseñarse para comprender ambas secuencias de ADN codificantes de la chaperona FKBP situadas cadena arriba de la proteína diana. Alternativamente, los dos dominios de FKBP pueden organizarse para incluir en sándwich la proteína diana. Una molécula de ADN recombinante que comprende ambos dominios de FKBP cadena arriba de la secuencia codificante del antígeno E1 de rubeola representa una realización preferente según la presente invención.

En una realización alternativa de la invención, la molécula de ADN recombinante se caracteriza porque una secuencia codificante de una chaperona PPI se encuentra situada cadena arriba de un antígeno E1 de rubeola y la otra secuencia codificante de una chaperona PPI se encuentra situada cadena abajo de la secuencia codificante de un antígeno E1 de rubeola.

El constructo de ADN que comprende dos dominios de chaperona, así como una secuencia codificante de un antígeno E1 de rubeola, preferentemente también contiene dos péptidos líncor de entre 10 y 100 aminoácidos entre dichos dominios. Con el fin de proporcionar una clonación sistemática, las secuencias de nucleótidos codificantes de estas dos secuencias de péptido líncor son diferentes. Esta diferencia en la secuencia de los nucleótidos no debe resultar necesariamente en una diferencia en la secuencia de aminoácidos de los péptidos líncor. En una realización preferente todavía adicional, las secuencias de aminoácidos de los dos péptidos líncor son idénticas. Dichas secuencias de péptido líncor idénticas, por ejemplo, resultarán ventajosas en el caso de que la proteína de fusión que comprende dos dominios de chaperona FKBP, así como la proteína E1 de rubeola, se utilicen en un inmunoensayo.

En los casos en que se desee liberar una o la totalidad de las chaperonas de una proteína de fusión según la presente invención, el péptido líncor se construye para que comprenda un sitio de corte proteolítico. Tal como se ha indicado anteriormente, el sitio de corte proteolítico también podría servir como polilíncor, es decir, podría proporcionar múltiples sitios de restricción de ADN para facilitar la fusión de los fragmento de ADN codificantes de una proteína E1 de rubeola y un dominio de chaperona. Una realización adicional de la presente invención se encuentra representada por una molécula de ADN recombinante codificante de una proteína de fusión que comprende por lo menos una secuencia polipeptídica codificante de una proteína E1 de rubeola, cadena arriba de la misma por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de una chaperona FKBP seleccionada de entre el grupo que consiste de FkpA, SlyD y factor trigger y que además comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un líncor peptídico que comprende un sitio de corte proteolítico.

Ha demostrado ser muy ventajoso un vector de expresión que comprende operablemente ligado una molécula de ADN recombinante según la presente invención, es decir, una molécula de ADN recombinante codificante de una proteína de fusión que comprende por lo menos una secuencia polinucleótida codificante de una proteína E1 de rubeola y cadena arriba de la misma por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de una chaperona FKBP, en la que la chaperona FKBP se selecciona de entre FkpA, SlyD y factor trigger.

El vector de expresión que comprende un ADN recombinante según la presente invención puede utilizarse para expresar la proteína de fusión en un sistema de traducción sin células o puede utilizarse para transformar una célula huésped. En una realización preferente, la presente invención se refiere a una célula huésped transformada con un vector de expresión según la presente invención.

Los vectores de expresión y clonación probablemente contendrán un marcador seleccionable, un gen codificante de una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de una célula huésped transformada con el vector, aunque dicho gen marcador puede encontrarse en otra secuencia polinucleótida cointroducida en la célula huésped. Únicamente aquellas células huésped que expresan el gen marcador sobrevivirán y/o crecerán bajo condiciones selectivas. Entre los genes de selección típicos se incluyen, aunque sin limitación, aquellos codificantes de proteínas que: (a) proporcionan resistencia a antibióticos o a otras sustancias tóxicas, por ejemplo ampicilina, tetraciclina, etc., (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos. La elección del marcador seleccionable correcto dependerá de la célula huésped y los marcadores que resultan apropiados para los diferentes huéspedes son conocidos de la técnica.

Los vectores que contienen la proteína E1 de rubeola de interés pueden introducirse en la célula huésped mediante cualquier método conocido de la técnica. Estos métodos varían dependiendo del tipo de huésped celular, incluyendo,

aunque sin limitación, la transfección utilizando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias, y la infección por virus. Pueden prepararse grandes cantidades de la proteína E1 de rubeola de la presente invención mediante la expresión de los polipéptidos de la presente invención en vectores o en otros vehículos de expresión en células huésped compatibles.

5 La construcción de un vector según la presente invención utiliza técnicas convencionales de ligación. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se cortan, adaptan y religan en la forma deseada para generar los plásmidos necesarios. Si se desea, se lleva a cabo un análisis de un modo conocido para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos  
10 construidos. Los métodos adecuados para construir vectores de expresión, preparar transcritos *in vitro*, introducir ADN en células huésped, y realizar análisis para evaluar la expresión y función, son conocidos por el experto en la materia. La presencia, amplificación y/o expresión génica puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo mediante transferencia southern convencional, transferencia northern para cuantificar la transcripción del ARNm, transferencia por puntos (análisis de ADN o ARN) o la hibridación *in situ*, utilizando una sonda apropiadamente marcada que puede basarse en una secuencia proporcionada en la presente memoria. El experto en la materia podrá concebir fácilmente  
15 maneras para modificar dichos métodos, si se desea.

Una realización preferente adicional de la presente invención que comprende un método para producir una proteína de fusión antígeno E1 de rubeola-chaperona inmunorreactiva, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 20 a. cultivar células huésped
- b. expresión de dicha proteína de fusión y
- 25 c. purificación de dicha proteínas de fusión,
- d. replegamiento para formar una conformación soluble e inmunorreactiva.

El método según la invención se refiere a la producción de una proteína de fusión de antígeno E de rubeola-chaperona inmunorreactivo, en la que la peptidil-prolil-isomerasa es una chaperona FKBP. Además, dicho método se refiere a una chaperona FKBP que se selecciona de entre el grupo que consiste de SlyD, FkpA y factor trigger.

Un objetivo adicional de la presente invención es un método para la detección, determinación y cuantificación de anticuerpos anti-rubeola de las subclases IgG y/o IgM en una muestra en la que el antígeno E1 de rubeola se utiliza como reactivo de captura y/o como pareja de unión de los anticuerpos. Todos los líquidos biológicos conocidos por el experto pueden utilizarse como muestras para la detección de anticuerpos anti-rubeola. Las muestras preferentes son líquidos corporales tales como sangre completa, sueros sanguíneos, plasma sanguíneo, orina, saliva, etc.

Con respecto a los procedimientos diagnósticos, son ventajas evidentes de una proteína de fusión soluble de antígeno E1 de rubeola, más preferentemente de una proteína soluble de antígeno E1 de rubeola-chaperona según la presente invención, por ejemplo, la estabilidad incrementada de la proteína E1 de rubeola bajo condiciones tamponadas fisiológicas, el incremento de la sensibilidad diagnóstica, la presencia de un número incrementado de epítomos conformacionales y la posibilidad de marcar fácilmente una proteína E1 de rubeola plegada correctamente.

45 Son marcajes bien conocidos los grupos marcadores o grupos efectores como grupos de unión a fase sólida. Una proteína de fusión soluble de antígeno E1 de rubeola marcada, más preferentemente una proteína soluble de antígeno E1 de rubeola-chaperona marcada representa una realización preferente adicional según la presente invención.

El grupo de marcaje puede seleccionarse de entre cualquier grupo marcador detectable conocido, tal como pigmentos, grupos de marcaje luminiscente, tales como grupos quimioluminiscentes, por ejemplo ésteres de acridinio o dioxetanos, o pigmentos fluorescentes, por ejemplo fluoresceína, coumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina y derivados de los mismos. Otros ejemplos de grupos de marcaje son complejos metales luminiscentes, tales como complejos de rutenio o europio, enzimas, por ejemplo las utilizadas para ELISA o para CEDIA (inmunoensayo de enzima donante clonado, por ejemplo el documento EP n° A-0 061 888) e isótopos radioactivos.

55 Los grupos efectores comprenden, por ejemplo, una pareja de una pareja de unión bioafín. Mientras se lleva a cabo un ensayo, el grupo efecto interactúa específicamente y preferentemente de modo no covalente, con el otro componente de la pareja de unión bioafín. Son ejemplos de parejas de unión adecuados son hapteno o antígeno/anticuerpo, biotina o análogos de biotina, tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina/avidina o estreptavidina, azúcar/lectina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico/ácido nucleico complementario y receptor/ligando, por ejemplo receptor de hormona esteroidea/hormona esteroidea. Los miembros preferentes de una pareja de unión comprenden hapteno, antígeno y hormona. Resultan especialmente preferentes los haptenos como la digoxina y la biotina y análogos de los mismos.

65 Preferentemente, se utiliza el complejo soluble que comprende una proteína E1 de rubeola y preferentemente una chaperona PPI en un inmunoensayo para la detección de anticuerpos contra la rubeola. En una realización preferente adicional, se utiliza un complejo soluble marcado que comprende un antígeno E1 de rubeola y preferentemente una chaperona PPI en un inmunoensayo para la detección de anticuerpos contra la rubeola. Más preferentemente, el com-

plejo marcado es un complejo intramolecular dentro de un polipéptido recombinante que comprende preferentemente la chaperona PPI y una proteína E1 de rubeola.

Los inmunoensayos son bien conocidos del experto en la materia. Los métodos para llevar a cabo dichos ensayos, así como las aplicaciones prácticas y procedimientos se resumen en libros de texto relacionados. Son ejemplos de libros de texto relacionados, Tijssen P., *Preparation of enzym-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates*, en "Practice and theory of enzyme immunoassays", 221-278, 1990, editores R.H. Burdon y v.P.H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam) y diversos volúmenes de Tijssen, en: "Methods in Enzymology", editores S.P. Colowick, N.P. Caplan y S.P., Academic Press, 1980), referentes a métodos de detección inmunológica, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121.

La nueva proteína de fusión soluble de antígeno E1 de rubeola, más preferentemente la nueva proteína soluble de antígeno E1 de rubeola-chaperona PPI puede utilizarse para mejorar ensayos de detección de anticuerpos anti-rubeola independientemente del modo de detección (por ejemplo ensayo de isótopos radioactivos, inmunoensayo enzimático, ensayo de electroquimioluminiscencia, etc.) o del principio de ensayo (por ejemplo ensayo de tira reactiva, ensayo sándwich o ensayo homogéneo, etc.).

Para la detección precoz fiable y sensible de una infección por rubeola, resulta esencial medir el anticuerpo antivirico en muestras de líquido corporal. El complejo soluble según la presente invención permite la detección de anticuerpos anti-rubeola bajo condiciones de tampón fisiológico. La detección de anticuerpos anti-rubeola es una parte valiosa de dichos sistemas combinados de detección de rubeola. En una realización preferente, la presente invención se refiere, por lo tanto, a sistemas de detección de rubeola que comprenden la detección de anticuerpos anti-rubeola basándose en la utilización de una proteína de fusión de antígeno E1 de rubeola, más preferentemente la utilización de una proteína de antígeno E1 de rubeola-chaperona.

Tal como es conocido de la técnica, los anticuerpos contra agentes infecciosos tales como bacterias, hongos o virus, preferentemente se detectan mediante un ensayo realizado según el concepto del doble puente antigénico (en ocasiones este concepto de ensayo también se denomina concepto de doble puente antigénico, debido a que se establece un puente de anticuerpo entre dos antígenos). En este tipo de ensayo, resulta necesaria la capacidad de un anticuerpo de unirse a por lo menos dos moléculas diferentes de un antígeno dado con sus dos (IgC, IgA, IgE) ó 10 (IgM) paratopos.

La detección de anticuerpos en líquidos corporales según el concepto del puente puede llevarse a cabo en muchos conjuntos de ensayo diferentes. Un conjunto simple comprende el recubrimiento directo de una fase sólida con un antígeno y la utilización del mismo antígeno en una forma marcada. Bajo condiciones de ensayo apropiadas, un anticuerpo en una muestra forma un puente entre el antígeno unido a la fase sólida y el antígeno marcado. Por lo tanto, únicamente en el caso de que el anticuerpo investigado se encuentre presente en la muestra se forma un puente y puede detectarse una señal. Las estructuras básicas de "antígeno de fase sólida" y "antígeno de detección" preferentemente son las mismas. Por ejemplo, puede utilizarse directa o indirectamente una proteína que comprende uno o varios epítopos recubriendo una fase sólida, y la misma proteína sintética, sin embargo, unida a un marcaje o marcador se utiliza como antígeno de detección. También resulta posible utilizar antígenos E1 de rubeola similares aunque diferentes, que presenten reactividad inmunológicamente cruzada en un ensayo de puente de doble antígeno. El requisito esencial para llevar a cabo este tipo de ensayos es que el epítipo o epítopos relevantes se encuentren presentes en ambos antígenos. Evidentemente existen muchas variantes del formato de ensayo de puente de doble antígeno. Dichas variantes comprenden, por ejemplo, el recubrimiento indirecto de una fase sólida con un antígeno E1 de rubeola. Preferentemente, una pareja de unión específica, más preferentemente el sistema biotina-estreptavidina (o avidina), en este tipo de sistema puede no llevar directamente un marcador (por ejemplo un isótopo radioactivo, enzima, molécula fluorescente, etc.), sino que puede ser indirectamente detectable llevando, por ejemplo, un hapteno (por ejemplo digoxina). En este caso, dicha detección indirecta puede llevarse a cabo con, por ejemplo, un anticuerpo anti-digoxina.

Por lo tanto, una realización preferente de la presente invención es un inmunoensayo según el concepto del puente de doble antígeno, que comprende un primer antígeno E1 de rubeola según la presente invención, y un segundo antígeno E1 de rubeola según la presente invención.

En una realización preferente adicional, la presente invención se refiere a un inmunoensayo según el concepto de puente de doble antígeno caracterizado porque se utiliza un primer complejo de proteína de fusión de antígeno E1 de rubeola como antígeno de captura y un segundo complejo de proteína de fusión de antígeno E1 de rubeola como antígeno de detección.

El complejo de proteína de fusión de antígeno E1 de rubeola, preferentemente el complejo de antígeno E1 de rubeola-chaperona tal como se describe en la presente invención, no sólo permite solubilizar diversas proteínas que de otra manera resultaría difícil de manipular, sino que también permite crear un inmunoensayo muy ventajoso según el concepto del puente de doble antígeno. Resulta una característica especialmente atractiva de dicho inmunoensayo según el concepto de puente de doble antígeno, que ahora resulta posible utilizar diferentes chaperonas para la formación de complejo con el antígeno unido a fase sólida y para la formación de complejo con el antígeno de detección, respectivamente. Dicho ensayo modificado permite mejoras adicionales en el caso de que se produzca el problema de la unión no específica. Los anticuerpos presentes en una muestra, que serían reactivos con una chaperona y que de esta manera podrían provocar una señal falsamente positiva, no formarán un puente en el caso de que se utilicen diferentes chaperonas para acomplejar el antígeno de fase sólida y el antígeno de detección, respectivamente. Por lo tanto, en este

## ES 2 356 383 T3

modo de la invención, la probabilidad de una señal positiva debida a la unión no específica se reduce en gran medida. En una realización preferente, por lo tanto, la presente invención se refiere a un inmunoensayo según el concepto del puente de doble antígeno, que se caracteriza porque la primera chaperona y la segunda chaperona de un primer y un segundo complejo de antígeno E1 de rubeola-chaperona difieren entre sí.

5

La mayoría de las chaperonas que se encuentran mejor caracterizadas han sido aisladas a partir de *Escherichia coli*, ampliamente utilizado en la investigación biotecnológica. Debido a que *Escherichia coli* es una especie bacteriana de amplia distribución, muchos mamíferos han desarrollado anticuerpos contra proteínas derivadas de esta bacteria. Con el fin de reducir la probabilidad de reacciones falsamente positivas causadas por dichos anticuerpos, resulta preferente utilizar por lo menos una chaperona PPI derivada de una especie bacteriana diferente, preferentemente una especie termofílica. Preferentemente, la chaperona se deriva de bacterias extremofílicas, especialmente del grupo de bacterias que comprende *Thermatoga maritima*, *Aquifex aeolicus* y *Thermus thermophilus*.

10

La utilización de un complejo de chaperona-antígeno en un inmunoensayo en general, y preferentemente en un inmunoensayo según el concepto del puente, también proporciona la posibilidad de derivatizar la chaperona de dicho complejo y no requiere la modificación del antígeno mismo. Se acepta generalmente que la modificación de una proteína por un segundo grupo químico, por ejemplo el acoplamiento de un marcaje a dicha molécula, comporta el riesgo de influir negativamente sobre el polipéptido. Por ejemplo, el epítipo bajo investigación puede encontrarse comprometido, o dicho marcaje puede provocar una unión no específica. Según la presente invención, ahora resulta posible derivatizar específicamente la chaperona dentro de un complejo de antígeno E1 de rubeola-chaperona.

15

20

En una realización preferente, un inmunoensayo según el concepto del puente de doble antígeno se caracteriza adicionalmente porque el primer complejo de antígeno E1 de rubeola-chaperona utilizado como antígeno de captura comprende un grupo de unión a una fase sólida.

25

En una realización preferente adicional, se lleva a cabo un inmunoensayo según el concepto del puente, que se caracteriza adicionalmente porque el segundo complejo de antígeno E1 de rubeola-chaperona utilizado como antígeno de detección comprende un grupo marcador.

30

La presente invención se refiere además a la utilización de por lo menos un antígeno de E1 de rubeola en un ensayo diagnóstico para la detección de anticuerpos anti-rubeola, así como aditivos habituales adicionales, según resulte necesario.

35

Un objetivo adicional de la invención es un kit de reactivos para la detección de anticuerpos contra la rubeola, que además de los aditivos de ensayo habituales para inmunoensayos, contiene por lo menos un antígeno de entre los antígenos E1 de rubeola adecuados para la unión específica a los anticuerpos de rubeola que deben determinarse y que también puede portar un marcaje, así como otros aditivos habituales, en caso necesario. En particular, el kit de reactivos contiene un antígeno E1 de rubeola y variantes de esta proteína que contienen la región N-terminal que comprende los puentes disulfuro Cys8-Cys13 y Cys59-Cys71, más preferentemente los puentes disulfuro Cys8-Cys13 y Cys59-Cys71 y Cys117-Cys130. Preferentemente, el kit de reactivos contiene un antígeno E1 de rubeola y variantes de esta proteína que contienen la región C-terminal que comprende los puentes disulfuro Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, más preferentemente la combinación de los puentes disulfuro Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, o la combinación de los puentes disulfuro Cys176-Cys185, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, todavía más preferentemente la combinación de puentes disulfuro Cys176-Cys185, Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401.

40

45

Una realización adicional de la presente invención es un kit de reactivos que contiene el antígeno E1 de rubeola y variantes de este péptido caracterizadas porque no presentan en el extremo C-terminal por lo menos la región transmembranal y el segmento de anclaje, así como por lo menos los aminoácidos 143 a 168, y que comprenden por lo menos los aminoácidos 315 a 412 de la secuencia de E1 de rubeola, en la que el antígeno E1 de rubeola se encuentra fusionado con una chaperona FKBP.

50

El kit de reactivos contiene además la combinación de un antígeno E1 de rubeola que contiene la región C-terminal que comprende por lo menos los puentes disulfuro Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, más preferentemente la combinación de los puentes disulfuro Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401 ó la combinación de los puentes disulfuro Cys176-Cys185, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, más preferentemente la combinación de los puentes disulfuro Cys176-Cys185, Cys225-Cys235, Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, y la región N-terminal que comprende por lo menos los puentes disulfuro Cys8-Cys13 y Cys59-Cys71, más preferentemente la combinación de los puentes disulfuro Cys8-Cys13 y Cys59-Cys71 y Cys117-Cys130.

55

60

Además, el kit de reactivos contiene soluciones de control y estándares, así como reactivos en una o más soluciones con los aditivos comunes, tampones, sales, detergentes, etc., que utilizaría el experto ordinario en la materia.

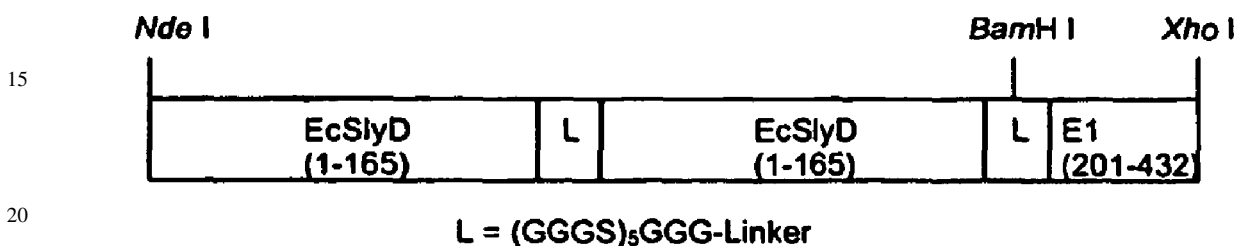
65

**Ejemplos**

**Ejemplo 1**

5 *Construcción de un plásmido de expresión que comprende EcSlyD en tándem y el fragmento de ectodominio de E1 de rubeola E1 (201 a 432)*

Basándose en el plásmido de expresión pET24a de Novagen (Madison, WI, USA), se llevaron a cabo las etapas de clonación siguientes. Se digirió el vector con NdeI y XhoI y se insertó un casete semisintético que comprendía SlyD en tándem y el fragmento 201 a 432 de E1 de rubeola. El fragmento de E1 de rubeola contiene residuos cisteína en las posiciones aminoácidas 349, 352, 368 y 401.



La inserción del plásmido resultante se secuenció y se encontró que codificaba la proteína de fusión deseada. La secuencia de ácidos nucleicos del casete insertado y la secuencia de aminoácido de la proteína de fusión resultante se muestran en el protocolo de secuencias de la presente invención.

**Ejemplo 2**

30 *Purificación y replegamiento acoplados de la proteína de fusión SS-E1 (201 a 432)*

Se cultivaron células *E. coli* BL21(DE3) que portaban el plásmido de expresión, en medio LB más canamicina (30 µg/ml) a una DO<sub>600</sub> de 1, y se indujo la sobreexpresión citosólica mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) hasta una concentración final de 1 mM a una temperatura de cultivo de 37°C. Cuatro horas después de la inducción, se recolectaron las células mediante centrifugación (20 minutos a 5.000 x g), se congelaron y se almacenaron a -20°C. Para la lisis celular, el pellet congelado se resuspendió en fosfato sódico 100 mM, pH 8,0, GuHCl 7,0 M, imidazol 10 mM a temperatura ambiente, y la suspensión resultante se agitó hasta la lisis celular completa durante dos horas. Tras la centrifugación y la filtración, se aplicó el lisado en una columna Ni-NTA (níquel-acetato de nitrilo) pre-equilibrada en el tampón de lisis anteriormente indicado. Con el fin de evitar la formación prematura de puentes disulfuro y la reorganización de SS, se incluyó TCEP 5 mM en el tampón de lavado como agente reductor que era compatible con las columnas de quelato metálico. Tras una etapa de lavado excesivo (>20 volúmenes de columna de tampón de lisis + TCEP), se desplazó el tampón de lisis caotrópica con fosfato sódico 50 mM, pH 7,8, cloruro sódico 100 mM, TCEP 5 mM, con el fin de inducir el replegamiento conformacional de la proteína unida a la matriz (se aplicaron por lo menos 10 volúmenes de columna de tampón de replegamiento para garantizar que no quedaba GuHCl residual en concentraciones caotrópicas). Posteriormente, se indujo el plegamiento oxidativo (es decir, la formación oxidativa de puentes de los residuos cisteína) mediante lavado con fosfato sódico 50 mM, pH 7,8, cloruro sódico 100 mM. Debido a la elevada concentración efectiva de iones divalentes de Ni<sup>2+</sup>, la formación de puentes disulfuro dentro de la proteína de fusión unida a la matriz es un proceso muy rápido. Previamente a la elución, se elevó la concentración de imidazol a 55 mM con el fin de eliminar una proteína contaminante con un peso molecular aparente de ~50 kDa. A continuación, se eluyó la proteína de fusión nativa mediante la aplicación de un gradiente de imidazol de 55 mM a 500 mM en fosfato sódico 50 mM, pH 7,8, cloruro sódico 100 mM. Se evaluaron las fracciones que contenían proteínas para su pureza (>95% según el SDS-PAGE) y se agruparon. Finalmente, se sometió la proteína a cromatografía de exclusión por tamaño y la fracción de dímeros se agrupó, se concentró y se evaluó para sus propiedades espectroscópicas.

**Ejemplo 3**

*Caracterización de la proteína de fusión de E1 de rubeola*

a. *Espectroscopía de U.V*

La SS-E1 (201 a 432) eluía en forma de proteína soluble y plegada de tipo nativo. Los espectros de U.V. de la proteína de fusión producida recombinantemente y replegada en matriz no indicaban ninguna tendencia a la agregación. Tal como se muestra en la fig. 1, la línea base del espectro de absorción d U.V. de SS-E1 (201 a 432) en condiciones de tampón fisiológico prácticamente era equivalente a la abscisa (más allá de 310 nm), indicando de esta manera que no se habían producido partículas dispersantes de la luz resultantes de fenómenos de autoasociación o agregación.



## ES 2 356 383 T3

Figura 1: espectro de U.V. de la proteína de fusión SS-E1 (201 a 432) tras el replegamiento asistido por matriz y elución con gradiente de imidazol. Se registró el espectro en un fotómetro Uvicon XS utilizando una distancia de camino óptico de 1 cm. Las condiciones de tampón eran fosfato sódico 50 mM, pH 8,0, cloruro sódico 100 mM e imidazol ~250 mM. Utilizando un coeficiente de extinción molar de 48.370 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para SS-E1 (201 a 432) se determinó que la concentración de proteínas era de 7,25 μM. La forma del espectro refleja la solubilidad del fragmento (201 a 432) de ectodominio E1 de rubeola con chaperona.

### b. Electroforesis en gel de SDS

Se verificó la pureza del polipéptido de fusión SS-E1 de rubeola residuos aminoácidos 201 a 432 mediante SDS-PAGE (fig. 2). Tras una cromatografía de dos etapas, la pureza del polipéptido de fusión superaba el 95%.

Figura 2: *purificación de SS-E1 (201 a 432) documentada mediante SDS-PAGE no reductora*. El gel teñido con tinción de Coomassie muestra (de izquierda a derecha) el estándar proteico M12 de Invitrogen (carril 1), el extracto crudo caotrópico de *E. coli* (fracción insoluble: carril 2; fracción soluble; carril 3), el eluido de IMAC (carril 5), la fracción de lavado que contiene una contaminación prominente con una masa molecular aparente de ~50 kDa (carril 7) y las fracciones de elución con imidazol de SS-E1 (201 a 432) (carriles 9 a 11). La pureza de la proteína de fusión excedía el 95% según la SDS-PAGE. No se observaron indicaciones de disulfuros mixtos o de compuestos intermoleculares covalentes de SS. Esto apunta a la formación cuantitativa de puentes de las cisteínas 349 y 352 y de las cisteínas 368 y 401, respectivamente.

### c. Análisis de FPLC (análisis de cromatografía líquida rápida de proteínas)

Aparte de su antigenicidad, el estado oligomérico, y la solubilidad y estabilidad de la proteína de fusión SS-E1 determinan su idoneidad para fines diagnósticos. Con el fin de dilucidar el estado oligomérico del fragmento de ectodominio recombinante de rubeola, se sometieron variantes de SS-E1 (201 a 432) que diferían en su contenido de cisteínas a filtración en gel analítica en una columna Superdex 200 HR 10/30. El tampón de corrido era fosfato sódico 50 mM, pH 7,5, y NaCl 100 mM. Se aplicaron 150 μl de la solución de SS-E1 (201 a 432) (concentración de proteínas ~1,0 mg/ml) en la columna SEC, y se realizó un seguimiento de la elución a partir de la absorción a 280 nm (fig. 3).

El resultado del experimento demuestra que todas las variantes de cisteínas de SS-E1 (201 a 432) se eluyeron cuantitativamente en ~12,8 ml, apuntando a que las proteínas de difusión aparentemente eran dimericas. Esto es consistente con la expectativa de que la introducción de un enlace disulfuro restringe el esqueleto polipeptídico del ectodominio de rubeola y conduce a una compactación global de la molécula. La evidente falta de asociados de alto peso molecular en el análisis de FPLC confirma los resultados de la SDS-PAGE y corrobora la suposición de que el replegamiento oxidativo acoplado a matriz de SS-E1 (201 a 432) rinde puentes disulfuro de tipo nativo que son bastante estables y que no tienden ni a la isomerización ni a la reorganización. La oligomerización de SS-E1 (201 a 432) probablemente se encuentran mediada por la pareja de fusión chaperona SlyD, que se ha informado que forma dímeros estables (Mukherjee *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37:183-186, 2003; Mitterauer *et al.*, *Biochem. J.* 342:33-39, 1999).

Figura 3: *todas las variantes de cisteínas de SS-E1 (201 a 432) forman dímeros solubles según la evaluación del análisis de FPLC*. Las variantes sin cisteínas y con puentes disulfuro de SS-E1 (201 a 432) se corrieron en una columna de filtración en gel analítica Superdex 200 HR 10/30 y se evaluaron para su estado oligomérico. El tampón de corrido era fosfato sódico 50 mM, pH 7,0, cloruro sódico 100 mM, EDTA 1 mM; la carga de proteínas era de ~200 μg. Se realizó un seguimiento de la elución a partir de la absorción a 280 nm. La SS-E1 (201 a 432) sin cisteínas, más extendida, eluyó a 12,6 ml (línea gris oscuro continua), mientras que las variantes más compactas, con doble (línea negra continua) y triple (línea negra discontinua) puente disulfuro eluyeron ambas a 12,9 ml. El estándar de proteína de HPLC de Roche (línea gris pálido discontinua) incluía β-galactosidasa (465 kDa), IgG (150 kDa), Fab (50 kDa), mioglobina (17 kDa) y el dipéptido Gly-Tyr (238 Da).

## Ejemplo 4

### Acoplamiento de biotina y grupos de rutenio a SS-E1 (201 a 432)

Se modificaron los grupos e-amino de la lisina de los ectodominios recombinantes de rubeola a concentraciones de proteína de ~10 mg/ml con marcajes de biotina y rutenio activados con N-hidroxi-succinimida, respectivamente. La proporción molar de marcaje/proteína variaba entre 2:1 y 5:1, dependiendo de la proteína de fusión respectiva. El tampón de reacción era fosfato sódico 150 mM (pH 8,0), NaCl 50 mM, EDTA 1 mM. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 15 minutos y se detuvo mediante la adición de L-lisina tamponada hasta una concentración final de 10 mM. Tras la reacción de acoplamiento, se eliminó el marcaje libre no reaccionado haciendo pasar el conjugado de proteínas crudo por una columna de filtración en gel (Superdex 200 HI Load).

## ES 2 356 383 T3

### Ejemplo 5

*Examen de la reactividad inmunológica de la proteína de fusión recombinante de EI de rubeola SS-EI (aminoácidos 20 a 432) en un ensayo inmunodiagnóstico; detección de los anticuerpos IgG anti-rubeola en sueros nativos*

5 Se evaluó la reactividad inmunológica de las diferentes proteínas de fusión en un analizador automático Elecsys® 2010 (Roche Diagnostics GmbH). Las mediciones se llevaron a cabo en el formato de sándwich de doble antígeno. De esta manera, se inmovilizó el conjugado con biotina (es decir, el antígeno de captura) sobre la superficie de una perla magnética recubierta con estreptavidina, mientras que el antígeno de detección portaba un catión rutenio acomplejado como grupo de señalización. La detección de señal en Elecsys® 2010 se basa en la electroquimioluminiscencia.

10 En presencia de un analito inmunoglobulina específico, el complejo cromogénico de rutenio forma un puente con la fase sólida y emite luz a 620 nm tras la excitación en un electrodo de platino. Los resultados de señal se proporcionan en unidades lumínicas arbitrarias. La medición se llevó a cabo con muestras positivas para IgG anti-rubeola procedentes de sueros recogidos por la Cruz Roja bávara.

20 (Tabla pasa a página siguiente)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 356 383 T3

TABLA 1

*Detección de anticuerpos IgG anti-rubeola mediante la utilización de antígeno SS-E1 (aminoácidos 201 a 432) de rubeola*

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Combinación de antígenos	E1 de rubeola (Cys-349/Cys-352 + Cys-368/Cys-401) -Biotina	
	E1 de rubeola (Cys-349/Cys-352 + Cys-368/Cys-401) -Rutenio	
Valor de corte	2.100	
muestra	recuento	COI
Cal 1	10.908	5,19
Cal 2	33.215	15,82
Neg 06020014	1.481	0,71
BRK 301	49.160	223,41
BRK 302	56.761	27,03
BRK 303	n.t.	n.t.
BRK 304	n.t.	n.t.
BRK 305	35.019	16,68
BRK 306	80.002	38,10
BRK 307	60.844	28,97
BRK 308	45.472	21,65
BRK 309	194.854	92,79
BRK 310	201.516	95,96
BRK 311	32.427	15,44
BRK 312	n.t.	n.t.
BRK 313	68.884	32,80
BRK 314	n.t.	n.t.
BRK 315	13.663	6,51
BRK 316	24.443	11,64
BRK 317	n.t.	n.t.
BRK 318	n.t.	n.t.
BRK 319	136.838	65,16
BRK 321	326.378	155,42
BRK 322	177.692	84,62
BRK 323	85.215	40,58
BRK 324	42.409	20,19
BRK 325	17.430	8,30
BRK 326	107.751	51,31
BRK 326	107.151	51,31
BRK 327	81.189	38,66
BRK 328	n.t.	n.t.
BRK 329	n.t.	n.t.
BRK 330	n.t.	n.t.
BRK 51	264.023	125,73

El análisis indicó que los sueros clasificados como positivos efectivamente eran positivos. Además, los resultados revelaron una clara diferenciación entre muestras positivas ( $COI \geq 1$ ) y negativas ( $COI < 1$ ).

65

## ES 2 356 383 T3

### Ejemplo 6

*Detección inmunológica de anticuerpos IgG anti-rubeola en sueros nativos mediante la utilización de SS-E1 (aminoácidos 315 a 432) de rubeola. Relevancia de estructura terciaria de tipo nativo para la actividad inmunológica*

5

La medición de tres combinaciones diferentes de variantes de E1 de rubeola, que forman puentes disulfuro entre las cisteínas 349 y 352, entre las cisteínas 349 y 352, así como entre las cisteínas 368 y 401, y entre las cisteínas 268 y 401. Se utilizó un antígeno sin cisteínas para la comparación con las variantes de rubeola anteriormente indicadas.

10

La medición se llevó a cabo con muestras (de estándar WHO) y muestras positivas para IgG anti-rubeola procedentes de sueros recogidos por la Cruz Roja bávara. Las mediciones se llevaron a cabo en un analizador automático Elecsys® 2010 (Roche Diagnostics GmbH) utilizando el formato sándwich de doble antígeno.

15

(Tabla pasa a página siguiente)

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**Tabla 2: detección de anticuerpos IgG anti-rubeola en sueros nativos mediante la utilización de antígeno SS-E1 (aminoácidos 315 a 432) de rubeola**

Combinación de antígenos	E1 de rubeola (sin Cys)-Biotina	E1 de rubeola (Cys-349/Cys-352) - Biotina	E1 de rubeola (Cys-349/Cys-352) + Biotina		E1 de rubeola (Cys-349/Cys-352) + Biotina		E1 de rubeola (Cys-368/Cys-401) - Biotina		E1 de rubeola (Cys-368/Cys-401) - Rutenio	
			recuento	COI	recuento	COI	recuento	COI	recuento	COI
WHO 10 IU/ml	1.629	0,99	1.412	0,99	1.385	0,72	1.151	0,96	1.199	0,96
WHO 2 10 IU/ml	1.651	1,00	1.420	1,00	1.930	1,00	1.199	1,00	1.199	1,00
WHO 3 50 IU/ml	1.646	1,00	1.458	1,03	4.007	2,08	1.236	1,03	1.236	1,03
WHO 4 150 IU/ml	1.641	0,99	1.477	1,04	8.805	4,56	1.434	1,20	1.434	1,20
WHO 5 300 IU/ml	1.655	1,00	1.498	1,06	15.990	8,28	1.701	1,42	1.701	1,42
Neg 0602035	1.602	0,97	1.413	1,00	n.d.	n.d.	1.152	0,96	1.152	0,96
Neg 0602036	1.771	1,07	1.484	1,05	1.421	0,74	1.158	0,97	1.158	0,97
Neg 0602037	1.563	0,95	1.392	0,98	1.359	0,70	1.165	0,97	1.165	0,97
Neg 0602038	1.610	0,98	1.406	0,99	1.391	0,72	1.143	0,95	1.143	0,95
BRK 301	1.691	1,02	1.494	1,05	6.723	3,48	1.505	1,25	1.505	1,25
BRK 302	1.608	0,97	1.421	1,00	7.700	3,99	1.384	1,15	1.384	1,15
BRK 303	1.602	0,97	1.418	1,00	48.855	25,31	6.349	5,30	6.349	5,30
BRK 304	1.957	1,19	1.699	1,20	50.481	26,15	5.709	4,76	5.709	4,76
BRK 305	1.674	1,01	1.482	1,04	5.467	2,83	1.311	1,09	1.311	1,09
BRK 306	1.653	1,00	1.419	1,00	11.469	5,94	1.292	1,08	1.292	1,08

ES 2 356 383 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

BRK 307	1.616	0,98	1.402	0,99	8.572	4,44	1.525	1,27
BRK 308	1.758	1,07	1.557	1,10	6.786	3,52	1.375	1,15
BRK 309	1.887	1,14	1.606	1,13	25.301	13,11	1.605	1,34
BRK 310	n.t.	n.t.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.794	1,50
BRK 311	1.689	1,02	1.483	1,04	23.529	12,19	1.232	1,03
BRK 312	1.597	0,97	1.407	0,99	4.569	2,37	n.d.	n.d.
BRK 313	1.589	0,96	1.427	1,00	9.980	5,17	1.408	1,17
BRK 314	1.969	1,19	1.666	1,17	24.287	12,58	2.344	1,96
BRK 315	1.621	0,98	1.397	0,98	2.911	1,51	1.149	0,96
BRK 316	1.693	0,98	1.419	1,00	3.954	2,05	1.232	1,03
BRK 317	1.573	0,95	1.413	1,00	19.782	10,25	n.d.	n.d.
BRK 318	1.597	0,97	1.501	1,06	102.732	53,23	8.361	6,97
BRK 319	1.625	0,98	1.419	1,00	18.070	9,36	1.508	1,26
BRK 321	1.606	0,97	1.488	1,05	41.297	21,40	1.970	1,64
BRK 322	1.634	0,99	1.424	1,00	22.746	11,79	2.034	1,70
BRK 323	1.567	0,95	1.397	0,98	11.705	6,06	1.429	1,19
BRK 324	1.621	0,98	1.409	0,99	6.509	3,37	1.165	0,97
BRK 325	1.617	0,98	1.433	1,01	3.306	1,71	2.755	2,30
BRK 326	1.588	0,96	1.425	1,00	14.232	7,37	2.329	1,94
BRK 327	1.611	0,98	1.432	1,01	11.226	5,82	1.554	1,30
BRK 328	1.602	0,97	1.405	0,99	26.680	13,82	1.537	1,28
BRK 329	1.681	1,02	1.480	1,04	22.449	11,63	1.174	0,98
BRK 330	1.644	1,00	1.450	1,02	2.066	1,07	1.232	1,03
BRK 51	1.637	0,99	1.423	1,00	31.886	16,52	2.358	1,97

## ES 2 356 383 T3

La comparación entre las diferentes variantes, que difieren en la formación de puentes disulfuro, demuestra la inmunorreactividad de SS-E1 (aminoácidos 315 a 432) de rubeola. Los puentes disulfuro entre las cisteínas 349 y 352 y entre las cisteínas 368 y 401 de SS-E1 (aminoácidos 315 a 432) de rubeola se habían formado correctamente. El análisis indicó que los sueros clasificados como positivos efectivamente eran positivos. Además, los resultados  
5 revelaron una clara diferenciación entre muestras positivas ( $COI^* \geq 1$ ) y negativas ( $COI^* < 1$ ).

### Ejemplo 7

10 *Detección inmunológica de anticuerpos IgG anti-rubeola en sueros nativos mediante la utilización de SS-E1 (aminoácidos 315 a 432) de rubeola y SS-E1 (aminoácidos 201 a 432) de rubeola*

La medición se llevó a cabo con muestras positivas para IgG anti-rubeola procedentes de sueros recogidos por la Cruz Roja bávara. Las mediciones se llevaron a cabo en un analizador automático Elecsys® 2010 (Roche Diagnostics  
15 GmbH) utilizando el formato sándwich de doble antígeno.

20 (Tabla pasa a página siguiente)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 356 383 T3

TABLA 2

*Detección de anticuerpos IgG anti-rubeola en sueros nativos mediante la utilización de SS-EI (aminoácidos 315 a 412) de rubeola y antígeno SS-EI (aminoácidos 201 a 431) de rubeola*

	E1 de rubeola (315 a 412, Cys-349/Cys-352 + Cys-368/Cys-401) - Biotina		E1 de rubeola (201 a 432, Cys-349/Cys-352 + Cys-368/Cys-401) - Biotina 500 ng/ml	
	E1 de rubeola (315 a 412, Cys-349/Cys-352 + Cys-368/Cys-401) - Rutenio		E1 de rubeola (201 a 432, Cys-349/Cys-352 + Cys-368/Cys-401) - Rutenio	
	recuento		recuento	
	750		701	
	23.528		25.666	
Cal 1	Valor de corte*	2.352	Valor de corte*	2.567
Cal 2				
	recuento	coi	recuento	Coi
IgG rub Cal 1	771	0,33	707	0,28
IgG rub Cal 1	729	0,31	696	0,27
IgG rub Cal 2	23.581	10,02	25.728	10,02
IgG rub Cal 2	23.475	9,98	25.604	9,97
IgG rub Crt 1	738	0,31	722	0,28
IgG rub Crt 2	11.018	4,68	13.459	5,24
BRK(12/04)_231	143.604	61,03	167.993	65,44
BRK(12/04)_232	44.207	18,79	52.976	20,64
BRK(12/04)_233	6.369	2,71	7.397	2,88
BRK(12/04)_234	25.172	10,7	29.834	11,62
BRK(12/04)_235	14.968	6,36	19.555	7,62
BRK(12/04)_236	21.997	9,35	26.676	10,39
BRK(12/04)_237	6.224	2,65	9.190	3,58
BRK(12/04)_238	213.025	90,53	249.577	97,22
BRK(12/04)_239	6.041	2,57	7.482	2,91
BRK(12/04)_240	7.021	2,98	9.036	3,52
BRK(12/04)_241	22.032	9,36	30.673	11,95
BRK(12/04)_242	16.693	7,09	22.727	8,85
BRK(12/04)_243	20.452	8,69	27.408	10,68
BRK(12/04)_244	42.915	18,24	57.870	22,54
BRK(12/04)_245	71.706	30,47	79.516	30,98
BRK(12/04)_246	81.777	34,75	93.339	36,36
BRK(12/04)_247	27.047	11,49	37.747	14,7
BRK(12/04)_248	713	0,30	663	0,26
BRK(12/04)_249	8.450	3,59	11.039	4,3
BRK(12/04)_250	14.114	6,0	16.071	6,26
BRK(12/04)_251	35.197	14,96	44.403	17,3
BRK(12/04)_252	27.067	11,5	32.125	12,51
BRK(12/04)_253	23.219	9,87	29.399	11,45
BRK(12/04)_254	60.055	25,52	74.010	28,83
BRK(12/04)_255	2.716	1,15	3.193	1,24
BRK(12/04)_256	2.900	1,23	3.703	1,44
BRK(12/04)_257	6.692	2,84	6.784	2,64
BRK(12/04)_258	68.138	28,96	75.097	29,25
BRK(12/04)_259	436.405	185,47	572.054	222,85
BRK(12/04)_260	726	0,31	689	0,27



## ES 2 356 383 T3

La comparación entre las variantes de diferente longitud demuestra una inmunorreactividad comparable de tanto SS-E1 (aminoácidos 315 a 412) de rubeola como SS-E1 (aminoácidos 201 a 432) de rubeola. Los puentes disulfuro entre la cisteína 349 y la cisteína 352, y entre la cisteína 368 y la cisteína 401 se forman correctamente en ambas variantes. El análisis indicó que los sueros clasificados como positivos efectivamente eran positivos. Además, los resultados revelaron una clara diferenciación entre muestras positivas (COI\* $\geq$ 1) y negativas (COI\* $<$ 1).

### Descripción adicional de las tablas

La expresión “\*valor de corte” es una señal para discriminar entre los resultados positivos y negativos, es decir, “señal $\geq$ valor de corte” es para las muestras positivas, y “señal $<$ valor de corte” es para las muestras negativas.

El término “COI” se define como el índice de valor de corte. El COI se calcula como señal de la muestra/señal en el valor de corte, es decir COI $\geq$ 1 para las muestras positivas y COI $<$ 1 para las muestras negativas.

### Lista de referencias

- Artherton and Shepard in “Solid phase peptide synthesis” *IRL Press*, Oxford, UK, 1989.
- Baron and Forsell, *Virology*. 1991 Dec; 185(2): 811-9
- Buchner, J., *Faseb J* 10 (1996) 10-19
- Chaye *et al.*, *J Clin Immunol*. 1993 Mar; 13(2) 93-100
- Creighton *et al.*, *TIBTECH* 1995 (13), 18-23;
- Raina, *Annu. Rev. Microbiol.* (1997) 51, 179-202
- Freedman, *Curr. Op. Struct. Biol.* (1995) 5, 85-91
- Gießauf *et al.*, *J. Immun. Meth.* 287 (2004), 1-11
- Green and Dorsett, *J. Virol.* (1986) 57, 893-898
- Gros *et al.*, 1997 *Virology* 230, 179-186
- Hobman *et al.*, 1994 (574-585) *Virology*
- Ho-Terry *et al.*, *Arch Virol.* 1985; 84(3-4): 207-15
- Houbenweyl in “Methode der Organischen Chemie” edited by E. Wunsch, vol 15-I et II, Thieme, Stuttgart, Germany, 1974
- Hottenrott, S., *et al.*, *J Biol Chem* 272 (1997) 15697-701
- Mitchell *et al.*, *Virus Research* 29 (1993), 33-54
- Mitterauer *et al.*, *Biochem. J.* (1999) 342, 33-39
- Mukherjee *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2003) 37, 183-186
- Newcombe *et al.*, *Clin Diagn Virol.* 1994 (3) 149-63
- Oker-Blom *et al.*, *J Virol.* 1984 (2): 403-8
- Qui *et al.*, *Journal of virology* 1994 (4086-4091)
- Ramm, K. and Pluckthun, A., *J Biol Chem* 275 (2000) 17106-13
- Sambrook, J., *et al.*, in “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (1989) -, Eds. J. 2nd ed. *Cold Spring Harbor Press*. NY
- Scholz, C., *et al.*, *Embo J* 16 (1997) 54-8
- Scholz, C., *et al.*, *J Mol Biol.*, 345, 1229-41, (2005)

## ES 2 356 383 T3

**Seppänen et al.**, *J. Clin. Microbiol* (1991) 1877-1882

**Seto et al.**, *J. Med. Virol.* (1994) 44, 192-199

5 **Starkey et al.**, *J. Clin. Microbiol.* (1995), 270-274)

**Terry et al.**, *Arch Virol.* (1985) 86, 29-36

10 **Terry et al** *Arch Viral.* (1988); 98, 189-97

**Tijssen, P.**, Preparation of enzym-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates in “Practice and theory of enzyme immunoassays” (1990) 221-278, Eds. R. H. Burdon and v. P. H. Knippenberg, *Elsevier*, Amsterdam)

15 **Tijssen, P.** “Methods in Enzymology” (1980), Eds. S. P. Colowick, N. O. Caplan and S. P., *Academic Press*

**Waxham and Wolinsky**, *Virology.* (1983) 126(1), 194-203

**Waxham and Wolinsky**, *Rev Infect Dis.* (1985) 133-9

20 **Waxham and Wolinsky**, *Virology* (1985) 153-65

**Weber et al.**, *Bull Soc Sci Med Grand Duche Luxemb.* (1997), 31-41

25 **Wolinsky et al.**, *J Virol.* (1991), 3986-94

**Wolinsky et al.**, Rubella (1996) *Fields Virology. Lippincott-Raven Publisher*, Philadelphia, 899-929

EP 0299673

30 EP 0061888

EP0944838

WO 03/000877

35 WO 98/13496

WO 03/000878

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Antígeno E1 soluble de rubeola y variantes de este péptido, **caracterizado** porque: (i) no presenta en el extremo C-terminal por lo menos la región transmembranal y el segmento de anclaje, así como por lo menos los aminoácidos 143 a 168, e (ii) contiene por lo menos la región que comprende los puentes disulfuro Cys349-Cys35 y Cys368-Cys401, y que comprende por lo menos los aminoácidos 315 a 412 de la secuencia de E1 de rubeola, en el que el antígeno E1 de rubeola se fusiona con una chaperona FKBP.
- 10 2. Antígeno E1 soluble de rubeola según la reivindicación 1, **caracterizado** porque presenta adicionalmente en el extremo C-terminal, la región  $\alpha$ -helicoidal entre los residuos aminoácidos 438 y 452.
3. Antígeno E1 soluble de rubeola según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque la región N-terminal que contiene por lo menos la región que comprende los puentes disulfuro Cys8-Cys13 y Cys59-Cys71.
- 15 4. Antígeno E1 soluble de rubeola según la reivindicación 3, **caracterizado** porque contiene adicionalmente por lo menos la región que comprende el puente disulfuro Cys117-Cys130.
- 20 5. Antígeno E1 soluble de rubeola según las reivindicaciones 4 y 5, **caracterizado** porque contiene adicionalmente por lo menos la región que comprende el puente disulfuro Cys225-Cys235.
6. Antígeno E1 soluble de rubeola según las reivindicaciones 4 y 5, **caracterizado** porque contiene adicionalmente por lo menos la región que comprende el puente disulfuro Cys176-Cys185.
- 25 7. Antígeno E1 soluble de rubeola según las reivindicaciones 1 a 6, en el que la proteína se produce en forma de una proteína de fusión recombinante.
8. Molécula de ADN recombinante, codificante de un antígeno E1 de rubeola, que comprende por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un antígeno E1 de rubeola según las reivindicaciones 1 a 6, en la que cadena arriba de la misma se encuentra por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de una chaperona FKBP.
- 30 9. Molécula de ADN recombinante según la reivindicación 8, **caracterizada** porque la chaperona FKBP se selecciona de entre el grupo que consiste de FkpA, SlyD y factor trigger.
- 35 10. Molécula de ADN recombinante según las reivindicaciones 8 y 9, **caracterizada** además porque comprende por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un línker peptídico de 10 a 100 aminoácidos situado entre dicha secuencia codificante de un antígeno E1 de rubeola y dicha secuencia codificante de la chaperona FKBP.
- 40 11. Molécula de ADN recombinante según las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizada** además porque por lo menos dos secuencias codificantes de una chaperona FKBP se encuentran situadas cadena arriba de la secuencia codificante de un antígeno E de rubeola.
- 45 12. Molécula de ADN recombinante según la reivindicación 11, **caracterizada** además porque una secuencia codificante de una chaperona FKBP se encuentra situada cadena arriba de un antígeno E de rubeola y la otra secuencia codificante de una chaperona FKBP se encuentra situada cadena abajo de la secuencia codificante de un antígeno E1 de rubeola.
13. Molécula de ADN recombinante según las reivindicaciones 11 y 12, **caracterizada** además porque comprende dos secuencias de ácidos nucleicos codificantes de un polipéptido línker de 10 a 100 aminoácidos.
- 50 14. Molécula de ADN recombinante según la reivindicación 13, en la que las dos secuencias de ácidos nucleicos codificantes de un línker de 10 a 100 aminoácidos son diferentes.
- 55 15. Vector de expresión que comprende operablemente ligada una molécula de ADN recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14.
16. Célula huésped transformada con un vector de expresión según la reivindicación 15.
- 60 17. Método para producir una proteína de fusión soluble e inmunorreactiva de antígeno E1 de rubeola-chaperona FKBP, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 65 a. cultivar células huésped según la reivindicación 16,
- b. expresar dicha proteína de fusión,
- c. purificar dicha proteína de fusión, y
- d. replegar en una conformación soluble e inmunorreactiva.

## ES 2 356 383 T3

18. Método según la reivindicación 17, en el que la chaperona FKBP se selecciona de entre el grupo que consiste de SlyD, FkpA y factor trigger.

5 19. Método para la detección y para la determinación y para la cuantificación de anticuerpos anti-rubeola de la subclase IgG y/o IgM en una muestra en la que el antígeno E1 de rubeola según las reivindicaciones 1 a 7 se utiliza como reactivo de captura y/o pareja de unión para los anticuerpos.

10 20. Inmunoensayo según el concepto del puente de doble antígeno, que comprende: un primer antígeno E1 de rubeola según las reivindicaciones 1 a 8, y un segundo antígeno E1 de rubeola.

21. Utilización de por lo menos un antígeno de E1 de rubeola según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en un ensayo diagnóstico *in vitro* para la detección de anticuerpos anti-rubeola.

15 22. Kit de reactivos para la detección de anticuerpos anti-rubeola, que contiene por lo menos un antígeno de los antígenos E1 de rubeola según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

20

25

30

35

40

45

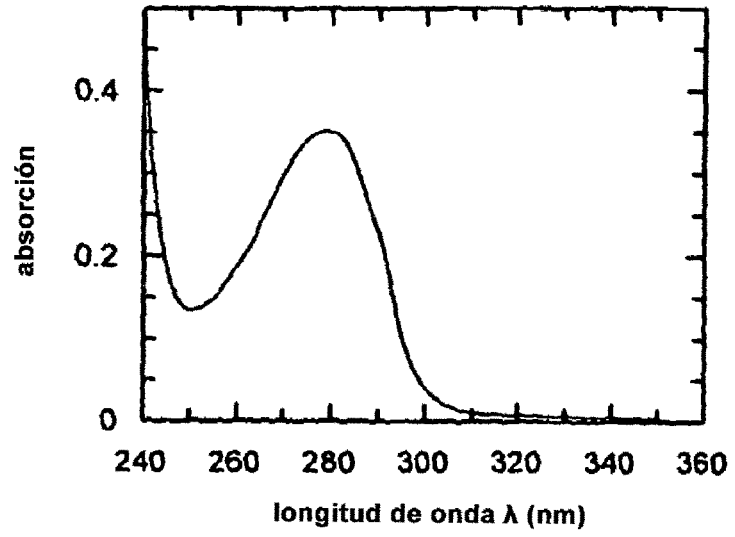
50

55

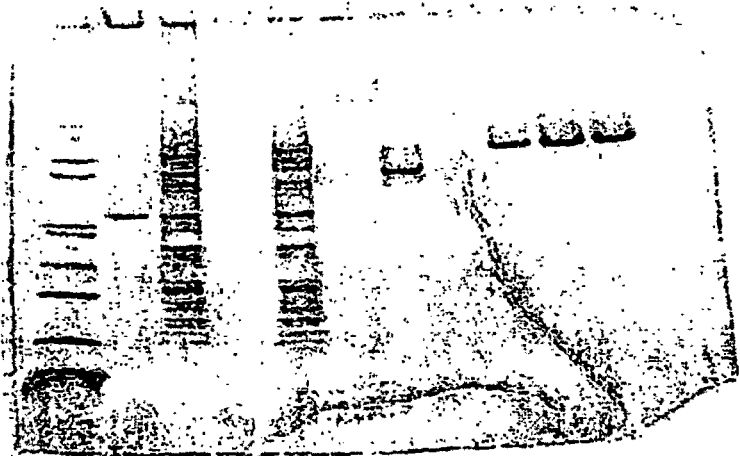
60

65

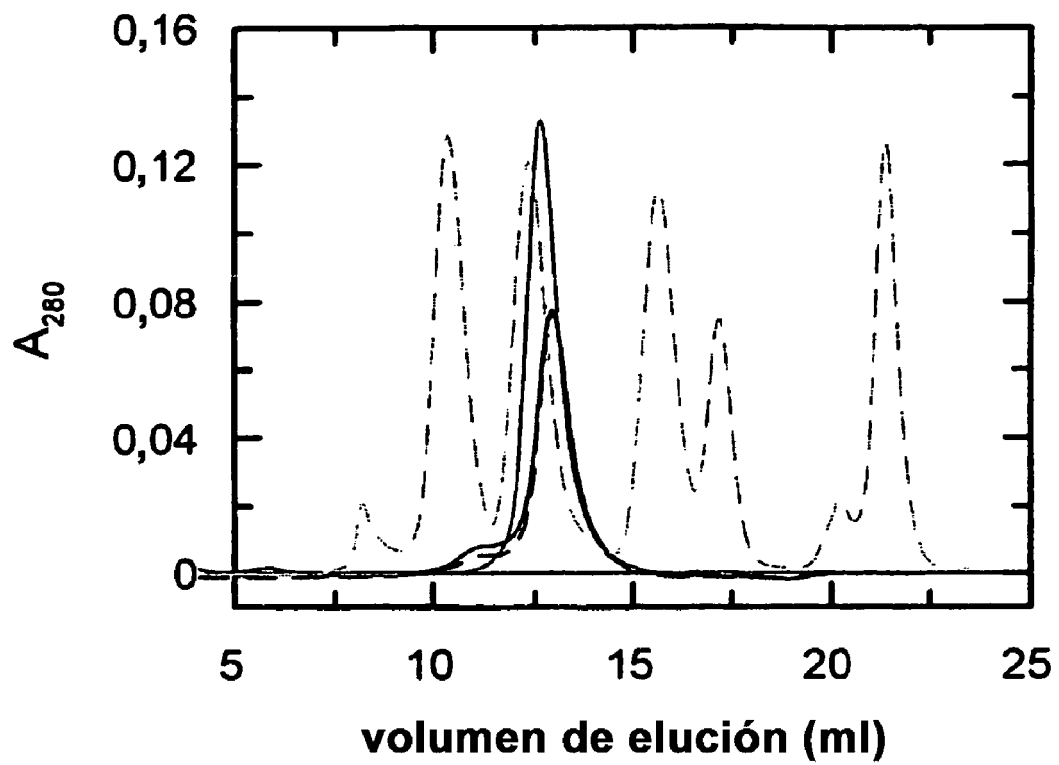
**Figura 1:**



**Figura 2:**



**Figura 3:**



# ES 2 356 383 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH  
F. Hoffmann-La Roche

5 <120> Expresión recombinante de variantes de proteína de cubierta E1 de rubeola en forma de proteína de fusión con chaperona, replegamiento de las mismas en una conformación soluble, de tipo nativo e inmunorreactiva (antigénica) y utilización de las mismas en la detección de anticuerpos anti-rubeola

<130> NDR6464

10 <160> 2

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

15 <211> 1965

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

20 <223> proteína de fusión de E1 de virus de la rubeola-chaperona

<400> 1

25

**gaattgtgag cggataacaa ttcccctcta gaaataattt tgtttaactt taagaaggag  
60**

30

**atatacatat gaaagtagca aaagacctgg tggtcagcct ggcctatcag gtacgtacag  
120**

35

**aagacgggtgt gttggttgat gagtctccgg tgagtgcgcc gctggactac ctgcatggtc  
180**

40

**acggttccct gatctctggc ctggaaacgg cgctggaagg tcatgaagtt ggcgacaaat  
240**

45

**ttgatgtcgc tgttggcgcg aacgacgctt acggtcagta cgacgaaaac ctggtgcaac  
300**

50

55

60

65

ES 2 356 383 T3

gtgttcctaa agacgtatct atgggcgttg atgaactgca ggtaggtatg cgtttcctgg  
360

5  
ctgaaaccga ccagggtccg gtaccggttg aaatcactgc ggttgaagac gatcacgtcg  
420

10  
tggttgatgg taaccacatg ctggccggtc agaacctgaa attcaacggt gaagttgtgg  
480

15  
cgattcgcga agcgactgaa gaagaactgg ctcatggtca cgttcacggc gcgcacgatc  
540

20  
accaccacga tcacgaccac gacggtggcg gttccggcgg tggctctggt ggcggatccg  
600

25  
gcggaggetc tgggggcgga tcaggcggtg gaaaggtcgc gaaagatctc gtagtgagcc  
660

30  
tcgettacca agtgcgcact gaggatgggg ttctggtaga cgaatcaccg gtatcggcac  
720

35  
cgctcgatta tttgcacggc catggtagcc taattagtgg tttagagaca gcacttgagg  
780

40  
gacacgaggt cggtgataag ttcgacgttg cagtgggagc taatgatgcc tatgggcaat  
840

45  
atgatgagaa tctcgttcag cgcgtgccga aggatgtgtt catgggtgta gacgagctcc  
900

50  
aagtgggcat gcggtttctt gccgagacgg atcaaggccc tgtgccagtc gagattaccg  
960

55  
cagtggagga tgaccatggt gtcgtggacg gaaatcacat gttagcggga caaaatttga  
1020

60  
aatttaatgt cgaggtcgtc gctatccgtg aggccaccga agaagagctt gcacacggcc  
1080

65



# ES 2 356 383 T3

atgtccatgg tgcccatgac catcaccatg accatgatca tgatggcggg gggtcggggtg  
1140

5

ggggaagtgg ggggtggatcc ggtggcgggtt ccggcgggtgg ctctgggtggc ggtgggtgacc  
1200

10

tggttgaata catcatgaac tacaccggta accagcagtc ccggtgggggt ctgggttccc  
1260

15

cgaacgctca cggtcaggac tgggcttccc cggttgctca gcgtcaactcc ccggacgctt  
1320

20

cccgtctggt tgggtgctacc ccggaacgtc ccgctctgcg tctgggtgac gctgacgacc  
1380

25

cgctgctgcg taccgctccg ggtccgggtg aagtttgggt taccocgggt atcgggtccc  
1440

30

aggctcgtaa agctgggtctg cacatccgtg ctgggtccgta cggtcacgct accggtgaaa  
1500

35

tgccggaatg gattcacgct cacaccacct ccgaccctg gctgccgccg ggtccgctgg  
1560

40

gtctgaaatt caaaaccgtt cgtcgggttg ctctgccgcg tgctctggct ccgcccgta  
1620

45

acgttcgtgt taccggttgc taccagtgtg gtaccocggc tctgggtgaa ggtctggctc  
1680

50

cgggtgggtg taactgccac ctgaccgtta acggtgaaga cgttgggtgcc tcccaccgg  
1740

55

gtaaattcgt taccgctgct ctgctgaaca ccccgccgcc gtaccaggtt tctgcggtg  
1800

60

gtgaatccga ccgtgcttcc gctcgtgtta tcgaccggc tgctcagtc ttcaccgggtg  
1860

65

ES 2 356 383 T3

ttgtttacgg tacccacacc accgctgttc tcgagcacca ccaccaccac cactgagatc  
1920

5

cggctgctaa caaagcccga aaggaagctg agttggctgc tgcca  
1965

10

<210> 2

<211> 615

<212> PRT

15

<213> secuencia artificial

<220>

<223> proteína de fusión de E1 de virus de la rubeola-chaperona

20

<400> 2

25

Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg  
1 5 10 15

30

Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu  
20 25 30

35

Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala  
35 40 45

40

Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala  
50 55 60

45

50

Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro  
65 70 75 80

55

Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe  
85 90 95

60

65

ES 2 356 383 T3

5           Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val  
                           100                           105                           110

10           Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln  
                           115                           120                           125

15           Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu  
                           130                           135                           140

20  
 25           Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His  
                           145                           150                           155                           160

30           Asp His Asp His Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
   165                           170                           175

35           Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Lys Val Ala Lys  
   180                           185                           190

40  
 45           Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg Thr Glu Asp Gly Val  
                           195                           200                           205

50           Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Asp Tyr Leu His Gly  
                           210                           215                           220

55           His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala Leu Glu Gly His Glu  
                           225                           230                           235                           240

60           Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala Asn Asp Ala Tyr Gly  
   245                           250                           255

65

ES 2 356 383 T3

5 Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro Lys Asp Val Phe Met  
 260 265 270

10 Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe Leu Ala Glu Thr Asp  
 275 280 285

15 Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val Glu Asp Asp His Val  
 290 295 300

20 Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln Asn Leu Lys Phe Asn  
 305 310 315 320

25 Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu Glu Glu Leu Ala His  
 325 330 335

30 Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His Asp His Asp His Asp  
 340 345 350

35 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 355 360 365

40 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asp Leu Val Glu Tyr Ile Met Asn  
 370 375 380

45 Tyr Thr Gly Asn Gln Gln Ser Arg Trp Gly Leu Gly Ser Pro Asn Ala  
 385 390 395 400

50 His Gly Pro Asp Trp Ala Ser Pro Val Ala Gln Arg His Ser Pro Asp  
 405 410 415

55

60

65

ES 2 356 383 T3

5 Ala Ser Arg Leu Val Gly Ala Thr Pro Glu Arg Pro Arg Leu Arg Leu  
420 425 430

10 Val Asp Ala Asp Asp Pro Leu Leu Arg Thr Ala Pro Gly Pro Gly Glu  
435 440 445

15 Val Trp Val Thr Pro Val Ile Gly Ser Gln Ala Arg Lys Ala Gly Leu  
450 455 460

20

25 His Ile Arg Ala Gly Pro Tyr Gly His Ala Thr Val Glu Met Pro Glu  
465 470 475 480

30 Trp Ile His Ala His Thr Thr Ser Asp Pro Trp Leu Pro Pro Gly Pro  
485 490 495

35 Leu Gly Leu Lys Phe Lys Thr Val Arg Pro Val Ala Leu Pro Arg Ala  
500 505 510

40

45 Leu Ala Pro Pro Arg Asn Val Arg Val Thr Gly Cys Tyr Gln Cys Gly  
515 520 525

50 Thr Pro Ala Leu Val Glu Gly Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asn Cys His  
530 535 540

55 Leu Thr Val Asn Gly Glu Asp Val Gly Ala Phe Pro Pro Gly Lys Phe  
545 550 555 560

60

65 Val Thr Ala Ala Leu Leu Asn Thr Pro Pro Pro Tyr Gln Val Ser Cys  
565 570 575

ES 2 356 383 T3

5 Gly Gly Glu Ser Asp Arg Ala Ser Ala Arg Val Ile Asp Pro Ala Ala  
580 585 590

10 Gln Ser Phe Thr Gly Val Val Tyr Gly Thr His Thr Thr Ala Val Leu  
595 600 605

15 Glu His His His His His His  
610 615

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65