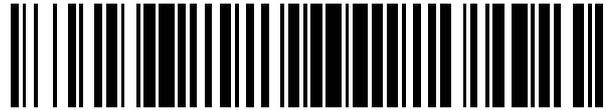


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 450 998**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2008** **E 08860033 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014** **EP 2222694**

54 Título: **Nuevas variantes de proteína de cubierta E1 de rubéola y su utilización en la detección de anticuerpos anti-rubéola**

30 Prioridad:

13.12.2007 EP 07024190

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

26.03.2014

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

SCHOLZ, CHRISTIAN;
BOLLHAGEN, RALF;
ENGEL, ALFRED;
FAATZ, ELKE;
SCHAARSCHMIDT, PETER;
UPMEIER, BARBARA y
ZARNT, TORALF

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 450 998 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

Nuevas variantes de proteína de cubierta E1 de rubéola y su utilización en la detección de anticuerpos anti-rubéola

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a antígenos E1 de rubéola recombinantes y a variantes de los mismos. Los antígenos comprenden los aminoácidos 201 a 432 y se caracterizan porque no presentan por lo menos la región transmembranal C-terminal y el segmento de anclaje (aminoácidos 453 a 481), así como por lo menos los aminoácidos 143 a 164. Los antígenos contienen además dos puentes disulfuro, es decir, contienen la región entre el puente disulfuro Cys225-Cys235 y Cys349-Cys352. La invención se refiere además a la producción de estos antígenos de doble puente disulfuro y a su utilización en un método de detección de anticuerpos anti-rubéola en sueros humanos. Es un objetivo importante en el desarrollo de los reactivos de antígeno para un inmunoensayo destinado a la detección de inmunoglobulinas proporcionar el máximo número posible de epitopos similares a los nativos estables. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención es una composición que comprende por lo menos dos antígenos E1 de rubéola, cada uno de los cuales contiene por lo menos dos puentes disulfuro, en la que las combinaciones de puentes disulfuro en los diversos antígenos difieren entre sí.

20 **Antecedentes de la invención**

El virus de la rubéola es el único miembro del género Rubivirus dentro de la familia Togaviridae. El virus, que es un virus ARN pequeño con cubierta (+), es un patógeno humano y provoca una enfermedad infantil autolimitante leve (sarampión alemán o rubéola) caracterizada por prurito, linfadenopatía y febrícula. Sin embargo, contraída en el primer trimestre del embarazo, puede causar muerte intrauterina del feto, aborto espontáneo o algunas anomalías asociadas al síndrome congénito de la rubéola. La tríada característica del síndrome congénito de la rubéola incluye cataratas, defectos cardíacos y sordera en el feto. Requiere programas de vacunación contra la rubéola y vigilancia del estado inmunológico de la mujer en edad fértil.

Las proteínas estructurales del virus de la rubéola se originan a partir de un único precursor polipéptido de 110 kDa, que es cortado proteolíticamente para rendir la proteína C de cápside y las proteínas de cubierta E2 y E1. E2 y E1 se encuentran glucosilados, forman heterodímeros no covalentes en la superficie del virión y son las dianas preferentes de la respuesta inmunológica humoral. El ectodominio anclado a membrana de la proteína E1, en particular, es inmunodominante y los anticuerpos contra E1 son abundantes en el suero de los individuos infectados por rubéola.

La proteína E1 de la rubéola, también denominada hemaglutinina de rubéola (ver la figura 1), presumiblemente consiste de un ectodominio grande (residuos 1 a 452), seguido de una única hélice transmembranal (residuos 453 a 468) y una cola citoplasmática corta (residuos 469 a 481). Los residuos 438 a 452, que preceden inmediatamente a la región transmembranal, probablemente también forman una hélice. El ectodominio de E1 porta 20 residuos de cisteína, que se encuentran unidos en diez puentes disulfuro. Los pares de cisteínas C(1)-C(2), C(3)-C(15), C(6)-C(7), C(9)-C(10), C(11)-C(12), C(13)-C(14), C(17)-C(18) y C(19)-C(20) pudieron confirmarse con certeza, mientras que el emparejamiento de los residuos de cisteína C(4), C(5), C(8) y C(16) sigue siendo ambiguo (Gros et al., *Virology* 230:179-186, 1997). El ectodominio se encuentra glucosilado en las tres asparaginas 76, 177 y 209.

Se han realizado varios intentos en la técnica anterior para producir la proteína E1 de la rubéola con fines diagnósticos. Inicialmente, se aislaron a partir del sobrenadante de células renales de hámster recién nacido (BHK-21) infectadas o de células Vero, fragmentos solubles de E1 para utilizarlos como antígenos en inmunoensayos. Posteriormente se desarrollaron diversos sistemas de expresión y secreción con el fin de producir versiones solubles e inmunorreactivas de E1 en huéspedes eucarióticos (Hobman et al., *Virus Res.* 31:277-289, 1994, y Seto et al., *J. Med. Virol.* 44:192-199, 1994). Pudo producirse una forma glucosilada y soluble de E1 de longitud completa en *Spodoptera frugiperda* infectada por baculovirus (Seppänen et al., *J. Clin. Microbiol.* 29, 1877-1882, 1991, y Oker-Blom 1989, *Virology* 172:82-91) y en células CHO (Perrenoud et al. *Vaccine* 23:480-488, 2004) y, más recientemente, en *Pichia pastoris* (Wen y Wang, *Intervirol.* 48:321-328, 2005). La expresión de partículas similares de tipo rubéola en células BHK (Grangeot-Keros et al., *J. Imm. Microbiol.* 33:2392-2394) y en una línea celular CHO establemente transfectada (Giessauf et al., *Arch. Virol.* 150:2077-2090, 2005) rindió antígenos de rubéola adecuados para fines diagnósticos. Estas partículas de tipo rubéola eran aglomerados difusos no infecciosos de las proteínas C, E2 y E1 de rubéola unidas covalentemente, y resultaban útiles para detectar inmunoglobulinas de los tipos M y G.

Las formas no glucosiladas de E1 pudieron producirse, en principio, de manera mucho más eficiente en un huésped procarionte. En uno de los primeros intentos, se fusionó una versión de longitud completa y una versión truncada (207-353) de E1 de rubéola con la proteína A de *Staphylococcus aureus* y se produjeron en *E. coli* (Terry et al., *Arch. Virol.* 104:63-75, 1989). Estas proteínas de fusión eran activas como antígenos, pero no muy solubles y por lo

tanto de utilidad limitada para la detección específica de anticuerpos anti-E1. En general, las variantes de E1 de huéspedes procarióticos mostraban una fuerte tendencia a la agregación, posiblemente debido a que no se encontraban glucosiladas o por que se encontraban unidas incorrectamente mediante disulfuros. En fusión con la glutatión-S-transferasa, sólo pudieron expresarse en una forma soluble y funcional fragmentos pequeños de E1 que comprendían tan sólo 75 ó 44 residuos aminoácidos (Newcombe et al., *Clinical and Diagnostic Virology* 2:149-163, 1994, y Starkey et al., *J. Clin. Microbiol.* 33:270-274, 1995). Pudieron obtenerse fragmentos de E1 más grandes, que comprendían 82 ó 171 residuos aminoácidos, al fusionarlos tanto con RecA como con β -galactosidasa (Wolinsky et al., *J. Virol.* 65, 3986-3994, 1991).

El replegamiento oxidativo de las proteínas ricas en cisteína de gran tamaño, tales como E1, resulta muy difícil debido a que los intermediarios incorrectamente plegados con disulfuros erróneos, que resultan atrapados durante el replegamiento, presentan una tendencia muy elevada a la agregación. Por lo tanto, muchos esfuerzos se han concentrado en encontrar epítomos de células B contiguos a lo largo de la cadena del polipéptido E1 y en la utilización de los péptidos solubles cortos correspondientes a modo de antígenos en inmunoensayos. Los anticuerpos generalmente muestran afinidades modestas para los antígenos péptidos pequeños y, por lo tanto, sigue siendo un objetivo importante producir fragmentos estables y solubles de E1 de elevada antigenicidad y en grandes cantidades, idealmente mediante la producción masiva como cuerpos de inclusión en un huésped procariótico, seguido de un procedimiento robusto de renaturalización.

En Newcombe et al., supra, se utilizaron proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa (GST) y E1 para producir fragmentos de antígeno E1 de rubéola en *E. coli* en una forma soluble. Sin embargo, sólo tras un truncado sustancial de la secuencia de E1 resultó viable una expresión soluble de la región sin cisteínas 243-286 (44 residuos aminoácidos). La solicitud de patente europea nº EP-A-0299673 da a conocer un péptido de residuos aminoácidos 207 a 353 que conserva las características de unión específica de Ig de rubéola.

Además, Starkey et al., supra, dan a conocer que un fragmento muy corto, de 44 a 75 residuos aminoácidos, de E1 de rubéola era soluble al fusionarlo con GST. Las proteínas de fusión con GST que contienen la secuencia completa de E1, así como los subfragmentos grandes de E1 se expresaron como cuerpos de inclusión que no podían ni purificarse ni renaturalizarse y, por lo tanto, fueron descartados.

La solicitud de patente europea nº EP-A-1780282 da a conocer la expresión recombinante y producción de antígenos de cubierta E1 de rubéola solubles que se caracterizan porque no presentan por lo menos la región transmembranal C-terminal y el segmento de anclaje, así como por lo menos el segmento entre los aminoácidos 143 y 164 en la parte intermedia de la molécula. Estos antígenos E1 de rubéola contienen por lo menos la región comprendida entre los puentes disulfuro Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401, y opcionalmente Cys225-Cys235. Según las enseñanzas del documento nº EP-A-1782082, resulta esencial que ambos puentes disulfuro en la parte C-terminal del antígenos se encuentren intactos, es decir, cerrados, para obtener una variante de E1 de rubéola que sea suficientemente antigénica y adecuada para la detección de anticuerpos contra el virus de la rubéola en una muestra.

Por lo tanto, el problema que debía resolverse era la generación de variantes de E1 de rubéola solubles que incluyesen combinaciones adicionales de epítomos estabilizados por disulfuros y que fuesen altamente solubles y altamente reactivos en términos inmunológicos (es decir, altamente antigénicos) y por lo tanto adecuados como antígenos para aplicaciones diagnósticas.

Descripción resumida de la invención

La invención se refiere a antígenos E1 de rubéola y a variantes de estos antígenos. Los antígenos comprenden los aminoácidos 201 a 432 y se caracterizan por la ausencia de por lo menos la región transmembranal C-terminal y el segmento de anclaje (aminoácidos 453 a 481), así como por lo menos el segmento entre los aminoácidos 143 y 164 de la parte intermedia de la molécula. Contienen además una región que comprende dos puentes disulfuro, es decir, la región entre los puentes disulfuro Cys225-Cys235 y Cys349-Cys352. La invención se refiere además a una composición que comprende por lo menos dos de estos antígenos E1 de rubéola, así como a la producción de estos antígenos de doble puente disulfuro y a su utilización en un método de detección de anticuerpos contra rubéola en una muestra.

Preferentemente, los antígenos E1 de rubéola se caracterizan además por la ausencia en el extremo C-terminal de la región alfa-helicoidal que comprende los residuos aminoácidos 438 a 452.

La invención se refiere además a una composición que comprende por lo menos dos antígenos E1 de rubéola, cada uno de los cuales comprende los aminoácidos 201 a 432, con la condición de que cada uno de dichos antígenos no presente secuencias correspondientes a los aminoácidos 143 a 164 y 454 a 481 del antígeno E1 nativo de rubéola y en los que los antígenos E1 de rubéola contengan dos puentes disulfuro en diferentes combinaciones.

Además, la invención se refiere a una molécula de ADN recombinante codificante de dicho antígeno E1 de rubéola. Preferentemente, el antígeno E1 de rubéola se expresa recombinantemente, más preferentemente se expresa en forma de una proteína de fusión de chaperón. La invención se refiere además a un vector de expresión que contiene el ADN anteriormente indicado codificante de un antígeno E1 de rubéola operablemente ligado o integrado. La invención se refiere además a una célula huésped transformada con dicho vector de expresión y además a un método para producir un antígeno E1 de rubéola soluble e inmunorreactivo, preferentemente una proteína de fusión que contiene una parte E1 y una parte chaperón, más preferentemente un chaperón perteneciente a la clase de las peptidil-prolil-isomerasas.

La presente invención da a conocer un método para la detección de anticuerpos anti-rubéola en una muestra humana, en la que el antígeno E1 de rubéola se utiliza como pareja de unión para los anticuerpos anti-rubéola. La invención comprende además un ensayo diagnóstico y un kit de reactivos para la detección de anticuerpos anti-rubéola, que contiene por lo menos uno de los antígenos E1 de rubéola.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un esquema de la topología de la proteína E1 de rubéola anclada a membrana, adaptado de Gros et al. (Virology 230:179-186, 1997). Los veinticuatro residuos de cisteína se numeran contiguamente según Gros et al. Se ilustran como círculos blancos con una cruz negra. Los tres sitios de N-glucosilación de E1 vírica madura se encuentran coloreados de negro y marcado con una Y. Las parejas de disulfuro asignadas según Gros et al. destacan por las cisteínas contiguas que forman bucles con las regiones de secuencia intermedias. El N-fragmento soluble de E1 se encuentra señalado con círculos gris claro; el C-fragmento soluble de E1 se encuentra señalado con círculos grises. La región fuertemente estimuladora de la agregación entre los aminoácidos 143 y 162 se encuentra marcada con círculos gris oscuro; las regiones modestamente estimuladoras de la agregación 134-142 y 163-168 se encuentran marcadas con círculos grises. La putativa región helicoidal contigua a membrana 438-452 se ilustra como círculos grises en una disposición de tipo helicoidal.

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de cubierta E1 de la cepa Therien de rubéola (Domínguez et al., Virology 177:225-238, 1990). Tras el procesamiento del polipéptido precursor de 110 kDa, la E1 madura comprende 481 residuos. Un segmento transmembranal putativo 453-468 (letras en negrita sobre fondo gris) ancla el ectodominio de E1 (1-452) a la superficie vírica. El segmento helicoidal putativo contiguo 438-452 se muestra en cursiva. Los veinticuatro residuos de cisteína dentro de E1 están marcados con una C en negrita y han sido numerados contiguamente según Gros et al. (supra). Los enlaces disulfuro importantes dentro de los N- y C-fragmentos solubles de E1 se muestran dentro de cajas. El N-fragmento 1-133 (gris claro) y el C-fragmento 201-432 (gris oscuro) se expresaron en fusión con SlyD* en tándem en E. coli y se replegaron a partir de cuerpos de inclusión, rindiendo antígenos E1 solubles.

La figura 3 muestra la evaluación de diversos antígenos E1 de rubéola para su capacidad de detectar específicamente las inmunoglobulinas anti-rubéola en sueros humanos. Los inmunoensayos se llevaron a cabo mediante la utilización de un analizador Elecsys® 2010 tal como se indica en el Ejemplo 6. Las señales relativas se normalizaron respecto al valor medio obtenido para siete muestras negativas para rubéola. Los sueros positivos para rubéola se obtuvieron de la Cruz Roja Bávara (Alemania) y los controles negativos para rubéola se obtuvieron de Trina International Bioreactives AG (Suiza). Todas las variantes de E1 eran proteínas de fusión SlyD-SlyD solubles y sus combinaciones de enlace disulfuro respectivas se proporcionan entre paréntesis (numeración contigua de los residuos de cisteína dentro de la molécula de E1). Todos los sueros clasificados como positivos se confirmaron como correctos.

La figura 4 muestra resultados experimentales adicionales de un diseño de inmunoensayo para detectar anticuerpos contra el virus de la rubéola en suero humano. Los inmunoensayos se llevaron a cabo mediante la utilización de un analizador Elecsys® 2010 tal como se indica en el Ejemplo 6. Las señales relativas se normalizaron respecto al valor medio obtenido para siete muestras negativas para rubéola. Los sueros positivos para rubéola se obtuvieron de la Cruz Roja Bávara (Alemania) y los controles negativos para rubéola se obtuvieron de Trina International Bioreactives AG (Suiza). Todas las variantes de E1 eran proteínas de fusión SlyD-SlyD solubles y sus combinaciones de enlace disulfuro respectivas se proporcionan entre paréntesis (numeración contigua de los residuos de cisteína dentro de la molécula de E1). Todos los sueros clasificados como positivos se confirmaron como correctos.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un fragmento de E1 de rubéola soluble e inmunorreactivo (es decir, antigénico) que comprende un segmento del polipéptido E1 entre los aminoácidos 201 y 432 y que porta dos puentes disulfuro.

Los antígenos E1 de rubéola según la invención comprenden los aminoácidos 201 a 432 y se caracterizan porque no presentan como mínimo la región transmembranal C-terminal y el segmento de anclaje, así como por lo menos el segmento entre los aminoácidos 143 y 164 en la parte intermedia de la molécula, es decir, se reivindica un antígeno E1 de rubéola con la condición de que dicho antígeno E1 de rubéola no presenta las secuencias correspondientes a los aminoácidos 143 a 164 y 454 a 481 del antígeno E1 de rubéola maduro o plegado similar a nativo y contiene dos puentes disulfuro, en los que:

a) se forma un puente disulfuro entre Cys225 y Cys235 (C13-C14) y se forma un segundo puente disulfuro entre Cys349 y Cys352 (C17-C18).

También se dan a conocer antígenos E1 de rubéola que comprenden los aminoácidos 201 a 432 de E1 y que también se caracterizan porque no presentan como mínimo la región transmembranal C-terminal y el segmento de anclaje, así como por lo menos el segmento entre los aminoácidos 143 y 164 en la parte intermedia de la molécula, es decir, se describe un antígeno E1 de rubéola con la condición de que dicho antígeno E1 de rubéola no presente las secuencias correspondientes a los aminoácidos 143 a 164 y 454 a 481 del antígeno E1 de rubéola maduro o plegado similar a nativo y de que contenga dos puentes disulfuro, en los que:

a) se forma un puente disulfuro entre Cys176 y Cys185 (C11-C12) y se forma un segundo puente disulfuro entre Cys225 y Cys235 (C13-C14) o

b) se forma un puente disulfuro entre Cys176 y Cys185 (C11-C12) y se forma un segundo puente disulfuro entre Cys349 y Cys352 (C17-C18) o

c) se forma un puente disulfuro entre Cys176 y Cys185 (C11-C12) y se forma un segundo puente disulfuro entre Cys368 y Cys401 (C19-C20).

También se da a conocer un antígeno E1 de rubéola que comprende los aminoácidos 169 a 432 y se caracteriza porque no presenta como mínimo la región transmembranal C-terminal y el segmento de anclaje, así como por lo menos el segmento entre los aminoácidos 143 y 164 en la parte intermedia de la molécula, es decir, se describe un antígeno E1 de rubéola con la condición de que dicho antígeno E1 de rubéola no presente las secuencias correspondientes a los aminoácidos 143 a 164 y 454 a 481 del antígeno E1 de rubéola nativo, en el que se forma un puente disulfuro entre Cys176 y Cys185.

La numeración de los puentes disulfuro proporcionada anteriormente se refiere a la figura 1 y corresponde a los residuos de cisteína C11-C12 (Cys176-Cys185), C13-C14 (Cys 225-Cys 235), C17-C18 (Cys 349-Cys 352) y C19-C20 (Cys 368-Cys 401). Según la numeración contigua de los residuos de cisteína, un antígeno E1 de rubéola preferente con dos puentes disulfuro comprende esta manera las combinaciones de puente disulfuro C13-C14 y C17-C18, o C13-C14 y C19-C20, o C13-C14 y C11-C12, o C11-C12 y C17-C18, o C11-C12 y C19-C20.

Un antígeno E1 de rubéola preferente comprende el fragmento del polipéptido E1 entre los aminoácidos 201 y 432 (201-432) y porta los puentes disulfuro C13-C14 y C17-C18, es decir, los puentes disulfuro Cys225-Cys235 y Cys349-Cys352. Se da a conocer además un antígeno E1 de rubéola que porta la misma combinación de disulfuros en un fragmento del polipéptido E1 que comprende la secuencia de aminoácidos 169-432 de E1.

Preferentemente, los antígenos E1 de rubéola según la invención se caracterizan además porque no presentan en el extremo C-terminal la región alfa-helicoidal putativa, que se ha confinado a los residuos aminoácidos 438 a 452 (Gros et al., *Virology* 230:179-186, 1997).

Según la invención, los antígenos E1 de rubéola preferentemente contienen combinaciones de dos puentes disulfuro. Ello significa que no se forman más de dos puentes disulfuro dentro de un antígeno E1 de rubéola. Con el fin de garantizar una combinación definida de enlaces disulfuro dentro del antígeno E1 de rubéola, todos los residuos de cisteína de E1 maduro que no participan en los enlaces disulfuro deseados son sustituidos por otro aminoácido similar a la cisteína en tamaño y estructura. Preferentemente, estos residuos de cisteína no deseados son sustituidos por alanina o serina. En consecuencia, los residuos aminoácidos sustituidos ni forman puentes disulfuro abortivos ni contribuyen a reacciones secundarias perjudiciales, tales como la reorganización de disulfuros. Las parejas de cisteínas correspondientes deseadas se pretende que se dispongan en estrecha proximidad durante el procedimiento de replegamiento *in vitro*, de manera que puedan construir fácilmente los enlaces disulfuro correctos y estabilizar de esta manera epítopos preformados inmediatamente después de incrementar el potencial redox. Mediante la formación de los puentes disulfuro correctos, el plegamiento tridimensional de tipo nativo (es decir, la conformación o estructura nativa) del antígeno E1 de rubéola maduro se restaura esencialmente en un área localmente confinada de manera que los anticuerpos anti-rubéola sean capaces de reconocer y unirse a las variantes del antígeno E1 de rubéola según la invención. Por ejemplo, un antígeno E1 de rubéola (201-432) que se espera que forme un primer puente disulfuro entre Cys225 y Cys235 (C13-C14) y un segundo puente disulfuro entre Cys349 y Cys352 (C17-C18) porta los residuos de cisteína en las posiciones 225, 235, 349 y 352. Sin embargo, sus residuos de cisteína en las posiciones 242 (C15), 287 (C16), 368 (C19) y 401 (C20) se sustituyen por alanina, serina

u otros residuos aminoácidos que no presentan fracciones tiol. Los residuos aminoácidos de sustitución se seleccionan según los requisitos estéricos y químicos: por una parte deben ajustarse a la estructura local y global de E1 de rubéola y, por otra parte, no deben interferir con la formación correcta de disulfuros mediante la formación de disulfuros mixtos que conducen a especies de proteína abortiva, incorrectamente plegada.

Según la presente invención, la expresión puente disulfuro se refiere a dos residuos de cisteína que se encuentran estrechamente próximos en la estructura tridimensional de una proteína y cuyas fracciones tiol pueden oxidarse para formar un enlace disulfuro covalente. La tasa de formación de enlaces disulfuro depende de la proximidad de los dos residuos de cisteína, definida como la probabilidad de que sus átomos de azufre se aproximen a menos de una distancia requerida para el intercambio tiol/disulfuro. Los puentes disulfuro, que también se denominan enlaces disulfuro (son sinónimos los enlaces SS y los puentes SS, respectivamente), constituyen contactos terciarios covalentes y habitualmente contribuyen a la estabilización de la conformación plegada. Estabilizan mediante la restricción de la flexibilidad conformacional de una cadena polipeptídica no plegada, es decir, la contribución de los enlaces SS a la estabilidad de una proteína es de naturaleza entrópica y no entálpica. 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 frecuentemente en las 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 la rubéola.

Habitualmente, los enlaces disulfuro estabilizan la conformación de la proteína, es decir, en proteínas satisfacen la tarea de bloquear el plegamiento de tipo nativo. Lo anterior permite una técnica de replegamiento secuencial basada en el desacoplamiento del replegamiento conformacional y oxidativo. El replegamiento conformacional se refiere a la reorganización de una cadena polipeptídica no plegada no ordenada al transferirla a condiciones de tampón fisiológico (=condiciones de replegamiento) para adoptar un plegamiento de tipo nativo. En su plegamiento de tipo nativo, las parejas de cisteínas correspondientes habitualmente se disponen en estrecha proximidad y la orientación adecuada, de manera que puedan formar enlaces disulfuro y de esta manera estabilizar la conformación de tipo nativo preexistente. La formación de los enlaces disulfuro, con la consecuencia de que se estabiliza el plegamiento tridimensional en un sentido local o global, también se denomina "replegamiento oxidativo". En la presente invención, el desacoplamiento del replegamiento conformacional y el oxidativo se utiliza para introducir enlaces disulfuro correctos de una manera definida. En primer lugar, se lleva a cabo el replegamiento conformacional in vitro de las diversas variantes de antígeno E1 bajo condiciones reductoras. A continuación, se lleva a cabo el replegamiento oxidativo mediante la eliminación del agente reductor respectivo, elevando el potencial redox e induciendo de esta manera la formación espontánea de los enlaces disulfuro favorables (es decir, correctos). Preferentemente, este procedimiento de replegamiento se lleva a cabo bajo condiciones caracterizadas por concentraciones de proteína efectiva bajas con el fin de evitar las reacciones de agregación. Está bien establecido que las concentraciones de proteína efectiva bajas durante el replegamiento incrementan el rendimiento de la proteína diana respectiva. Una técnica bien establecida de replegamiento de las proteínas in vitro es el denominado replegamiento acoplado a matriz. La inmovilización de moléculas de proteína no plegada en una fase sólida y el replegamiento de la proteína unida a matriz garantiza concentraciones efectivas bajas, ya que las moléculas de proteína se encuentran aisladas (diluidas infinitamente) y son incapaces de interactuar con moléculas de proteína vecinas. De esta manera, se suprimen eficientemente reacciones secundarias perjudiciales no deseadas, tales como la agregación de intermediarios de replegamiento hidrofóbicos.

Los antígenos E1 de rubéola según la invención pueden contener uno o más aminoácidos adicionales en sus extremos N- o C-terminales o en ambos. En el caso de que se añadan aminoácidos adicionales, resulta importante que estos aminoácidos adicionales no debiliten las propiedades antigénicas del antígeno, es decir, que no interfieran con la utilización del antígeno en un inmunoensayo, por ejemplo reduciendo la solubilidad global del antígeno. La capacidad del antígeno de ser reconocido y de ser ligado por anticuerpos anti-rubéola en una muestra debe mantenerse.

Según el documento nº EP-A-1780282, ha podido demostrarse que pueden producirse antígenos de cubierta E1 de rubéola solubles expresados recombinantemente que resultan adecuados para la utilización en un inmunoensayo para la detección de anticuerpos anti-rubéola. Estos antígenos se caracterizan por la ausencia de por lo menos la región transmembranal C-terminal y el segmento de anclaje, así como por lo menos los aminoácidos 143 a 164 en la parte intermedia de E1. Estos antígenos contienen por lo menos la región que comprende los puentes disulfuro C-terminales Cys349-Cys352 y Cys368-Cys401 (C17-C18 y C19-C20) y opcionalmente, además, Cys225-Cys235 (C13-C14), indicando que incluso un tercer puente disulfuro puede ser ventajoso para obtener un antígeno adecuado para la utilización en inmunoensayos.

Inesperadamente se ha encontrado que se obtienen variantes de E1 de rubéola antigénicas solubles adicionales que comprenden los aminoácidos 201 a 432 mediante la delección de la región transmembranal y el segmento de anclaje C-terminal, preferentemente entre los residuos aminoácidos 453 y 481. Según la invención, el antígeno E1 de

- rubéola comprende un fragmento soluble que porta dos enlaces disulfuro. Preferentemente, se forman esencialmente dos enlaces disulfuro en el antígeno para estabilizar una conformación antigénica, que resulta adecuada para ser reconocida y ligada por inmunoglobulinas anti-E1 y que, de esta manera, resulta adecuada para detectar las inmunoglobulinas anti-E1. El segmento de E1 que porta dos puentes disulfuro puede comprender el enlace disulfuro Cys225-Cys235 a Cys349-Cys352 (C13-C14 a C17-C18). También se dan a conocer segmentos de E1 que comprenden el enlace disulfuro Cys225-Cys235 a Cys368-Cys401 (C13-C14 a C19-C20) o el puente disulfuro Cys176-Cys185 a Cys225-Cys235 (C11-C12 a C13-C14) o el puente disulfuro Cys176-Cys185 a Cys349-Cys352 (C11-C12 a C13-C14) o el puente disulfuro Cys176-Cys185 a Cys368-Cys401 (C11-C12 a C19-C20).
- Más preferentemente, también se delecciona la región transmembranal entre los aminoácidos 453 y aproximadamente 468. Dentro de la parte intermedia de E1 de rubéola también se deleccionan por lo menos los residuos aminoácidos 143 a 164.
- Estos nuevos antígenos E1 de rubéola han demostrado ser solubles y estables bajo condiciones de tampón fisiológico sin la adición de detergentes, por ejemplo en un sistema de tampón fosfato a temperatura ambiente. Son altamente inmunorreactivos (es decir, son antigénicos) en un ensayo serológico y adecuados para la detección de anticuerpos anti-rubéola en suero humano.
- Según la invención también se encuentran incluidas variantes de los antígenos E1 de rubéola. El término "variantes" en el presente contexto se refiere a una proteína esencialmente similar a dicha proteína. En particular, una variante puede ser una isoforma que muestra sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la isoforma más prevalente. Preferentemente, dicha proteína esencialmente 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 90% y todavía más preferentemente de por lo menos 95%. El término "variante" se refiere además a una proteína modificada post-traduccionalmente, tal como una proteína glucosilada o fosforilada. Una variante también es una proteína o antígeno que ha sido modificado, por ejemplo mediante unión covalente o no covalente de un marcaje o fracción portadora a la proteína o antígeno. Los posibles marcajes, grupos informadores o fracciones de señalización, son radioactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes, electroquimioluminiscentes, enzimas u otros, por ejemplo como la digoxigenina. Estos marcajes son conocidos por el experto en la materia. Son variantes de marcaje adicionales los grupos de unión a fase sólida, por ejemplo la biotina o derivados de biotina unidos a proteína; se proporciona posteriormente en la presente memoria una descripción detallada de los marcajes.
- Un "antígeno E1 de rubéola" es una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos de E1 de rubéola que resulta adecuada para la utilización en un ensayo inmunológico. Ello se refiere a que el antígeno es capaz de unirse a, o ser reconocido y ser ligado por, anticuerpos específicos para rubéola, por ejemplo anticuerpos anti-E1 de rubéola presentes en una muestra.
- Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición de por lo menos dos antígenos E1 de rubéola diferentes. La expresión "antígeno E1 de rubéola" incluye una composición que contiene una combinación de más de un antígeno E1 de rubéola. En particular, una realización preferente de la invención es una composición que comprende por lo menos dos antígenos E1 de rubéola, cada uno de los cuales comprende los aminoácidos 201 a 432 ó los aminoácidos 169 a 432, con la condición de que cada uno de dichos antígenos no presente secuencias correspondientes a los aminoácidos 143 a 164 y 454 a 481 del antígeno E1 nativo de rubéola y en los que cada uno de los como mínimo dos antígenos E1 de rubéola contienen dos puentes disulfuro en diferentes combinaciones.
- Una composición preferente de por lo menos dos antígenos E1 de rubéola diferentes comprende un antígeno con un puente disulfuro entre Cys176 y Cys185 (C11-C12) y un segundo puente disulfuro entre Cys225 y Cys235 (C13-C14). El otro antígeno en esta composición preferentemente contiene un puente disulfuro entre Cys225 y Cys235 (C13-C14) y un segundo puente disulfuro entre Cys349 y Cys352 (C17-C18). Opcionalmente pueden incluirse antígenos adicionales en dicha composición, preferentemente un tercer antígeno E1 de rubéola que contiene un puente disulfuro entre Cys349 y Cys352 (C17-C18) y un puente disulfuro entre Cys368 y Cys401 (C19-C20).
- En una realización preferente según la invención, el antígeno E1 de rubéola es producido en forma de una 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 una parte proteína correspondiente a un antígeno E1 de rubéola según la invención y por lo menos una parte proteína derivada de otra proteína que presenta la función de actuar como pareja de fusión.
- El plegamiento y purificación de las proteínas con frecuencia resulta facilitado por su fusión covalente con etiquetas o proteínas de pareja que se pliegan robustamente por sí mismas. Entre estos módulos de fusión se incluyen la proteína de unión a maltosa, la glutatión-S-transferasa, la tiorredoxina, NusA, DsbA y chaperones como FkpA. La utilización de estos módulos de fusión habitualmente está destinada a 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. Preferentemente los chaperones, más preferentemente los chaperones de la clase de las peptidil-prolil-isomerasas, más preferentemente los chaperones de la familia FKBP de peptidil-prolil-isomerasas, son utilizados como proteínas de fusión en el polipéptido de fusión de E1 de rubéola.

Los chaperones, conocidos como "ayudantes 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 ayudantes de plegamiento se subdividen en catalizadores de plegamiento y chaperones. Los catalizadores de plegamiento aceleran las etapas limitadoras de velocidad en el plegamiento de las proteínas debido a su función catalítica. Es conocido que los chaperones se unen a proteínas desnaturalizadas o parcialmente desnaturalizadas y de esta manera ayudan a renaturalizar o, alternativamente, a degradar las proteínas. De esta manera, al contrario que los catalizadores de plegamiento, los chaperones ejercen una mera función de unión. Se describen en detalle ejemplos de catalizadores y chaperones en el documento WO n° 03/000877.

Actualmente se conocen varias familias diferentes de chaperones. Todos estos chaperones se caracterizan por su capacidad de unirse a proteínas no plegadas o parcialmente no plegadas y presentan una función fisiológica que se asocia al plegamiento correcto de las proteínas o a la degradación y eliminación de las proteínas desnaturalizadas o agregadas. Se ha demostrado que una expresión incrementada de los chaperones puede facilitar la producción recombinante de una proteína. También es conocido que puede conseguirse una producción incrementada de las proteínas mediante la utilización de un constructo génico codificante de tanto la secuencia de la proteína diana como de una secuencia de chaperón. En todas estas aplicaciones de chaperones como herramientas biotecnológicas, el obstáculo principal es encontrar una chaperona apropiada y funcional para una molécula diana dada. Debido a que muchos chaperones muestran una especificidad de sustrato estrecha y funcionan en un modo dependiente de la energía, la búsqueda de una pareja de unión apropiada (es decir, solubilizadora) para una proteína diana dada dista mucho de ser fácil. Brevemente, el enfoque al uso de los chaperones para obtener rendimientos de producción incrementados de proteínas de plegamiento de tipo nativo se basa principalmente en la unión y, de esta manera, solubilización, de proteínas chaperonas. Tras la producción recombinante de una proteína de fusión que comprende chaperón y proteína diana, la fracción chaperón habitualmente se escinde del polipéptido de fusión resultante, rindiendo la proteína deseada en forma pura.

Según la presente invención, la proteína de fusión producida recombinantemente que contiene un módulo de fusión y un antígeno E1 de rubéola puede obtenerse fácilmente a partir de cuerpos de inclusión en una forma soluble y funcional. Además, la proteína E1 de rubéola dada a conocer es parte de una proteína de fusión, muestra una elevada solubilidad bajo condiciones de tampón fisiológico y pueden obtenerse fácilmente en una estructura o conformación de tipo nativo e inmunorreactivo (es decir antigénica).

La proteína de fusión de E1 de rubéola según la presente invención resulta muy fácil de manipular. En otras palabras, resulta fácil de renaturalizar dicha proteína de fusión con altos rendimientos tras un protocolo robusto y simple de replegamiento. El polipéptido no estructurado no plegado desnaturalizado puede replegarse de diferentes maneras, resultando todas en una forma de tipo nativo termodinámicamente estable y soluble que es antigénica. El replegamiento se consigue con altos rendimientos, tanto mediante diálisis como mediante dilución rápida, así como mediante cromatografía de exclusión por tamaño renaturalizante o replegamiento asistido por matriz. Preferentemente se utilizan técnicas de replegamiento que permiten concentraciones de proteínas eficaces muy bajas durante la renaturalización, tales como la cromatografía de exclusión por tamaño renaturalizante o el replegamiento asistido por matriz. Las técnicas de replegamiento tales como la diálisis o la dilución rápida también funcionan en el caso de que las concentraciones de proteína se mantengan bajas durante el replegamiento.

Preferentemente se produce una proteína soluble según la presente invención mediante la fusión de un antígeno E1 de rubéola con un chaperón de la clase de las peptidil-prolil-isomerasas. Por lo tanto, una realización preferente según la invención se refiere a la fusión de un antígeno E1 de rubéola con una chaperona de la clase de las peptidil-prolil-isomerasas, preferentemente con una chaperona FKBP y más preferentemente con una chaperona SlyD o FkpA.

Aparte de los métodos de producción recombinante, los antígenos E1 de rubéola según la invención también pueden producirse mediante síntesis química, en donde la síntesis puede llevarse a cabo en solución homogénea o en fase sólida, tal como es conocido de la técnica.

Los antígenos E1 de rubéola anteriormente indicados pueden optimizarse según los requisitos de un inmunoensayo específico para la detección de anticuerpos anti-rubéola. Por ejemplo, los antígenos pueden llevarse a un estado monomérico u oligomérico definido. En una forma oligomérica, los antígenos resultan adecuados para la utilización en un ensayo inmunológico para la detección de anticuerpos IgM en una muestra humana. Los polipéptidos de fusión de E1 según la invención pueden polimerizarse, por ejemplo mediante entrecruzamiento químico, resultando

en un antígeno que resulta preferentemente reconocido y ligado por anticuerpos IgM. En una realización preferente adicional de la presente invención puede obtenerse un polímero mixto compuesto de las proteínas E1, E1 y proteína nuclear C de rubéola. Las proteínas E2 y nuclear de rubéola son antígenos de rubéola inmunodominantes bien conocidos de la técnica.

5 La proteína E1 de rubéola según la invención también puede prepararse mediante técnicas de ADN recombinante. La expresión "molécula de ADN recombinante" se refiere a una molécula que se genera 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 ingeniería genética o mediante síntesis química. Para
10 ello pueden unirse entre sí segmentos polinucleótidos de las funciones deseadas con el fin de generar una combinación deseada de funciones.

15 Pueden producirse grandes cantidades de los polinucleótidos mediante replicación en una célula huésped adecuada. Los fragmentos de ADN naturales o sintéticos codificantes de las proteínas o fragmentos de las mismas se incorporan en constructos polinucleótidos recombinantes, típicamente constructos de ADN, capaces de introducirse y replicarse en una célula procariótica o eucariótica inferior o superior, tal como se indica en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989).

20 La expresión eucariotas inferiores se refiere a células huésped tales como levaduras, hongos y similares. Los eucariotas inferiores generalmente, aunque no necesariamente, son unicelulares. El término "procariotas" se refiere a huéspedes tales como *E. coli*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Bacillus subtilis* o *Streptomyces*. Todos estos huéspedes se encuentran contemplados en la presente invención. Los eucariotas inferiores preferentes son las levaduras, particularmente especies de *Schizosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Kluiveromyces*, *Pichia* (por ejemplo *Pichia pastoris*), *Hansenula* (por ejemplo *Hansenula polymorpha*),
25 *Schwaniomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces* y similares. *Saccharomyces cerevisiae* y *S. carlsbergensis* son los huéspedes levadura utilizados más comúnmente y son huéspedes fúngicos convenientes. La expresión "eucariotas superiores" se refiere a células huésped derivadas de animales, tales como mamíferos, reptiles, insectos y similares. Las células huésped eucariotas superiores actualmente preferentes se derivan de las células de hámster chino (por ejemplo CHO), de mono (por ejemplo las células COS y Vero), las células renales de hámster neonato (BHK), las células renales de cerdo (PK15), las células renales 13 de conejo (RK13), la línea celular 143B de osteosarcoma humano, la línea celular HeLa humana y líneas celulares de hepatoma humano tales como HepG2 y líneas celulares de insecto (por ejemplo *Spodoptera frugiperda*). Las células huésped pueden proporcionarse en cultivos de suspensión o en matraz, cultivos de tejidos, cultivos de órganos y similares.

35 Un objeto adicional de la presente invención se refiere a una molécula de ADN recombinante, codificante de un antígeno E1 de rubéola, que comprende por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un antígeno E1 de rubéola que comprende una región que contiene dos puentes disulfuro, tal como se indica posteriormente. Un objeto preferente de la invención es una molécula de ADN recombinante, codificante de un antígeno E1 de rubéola, que comprende por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un antígeno E1 de rubéola, en el que
40 cadena arriba del mismo se encuentra por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de una chaperona de la clase de las peptidil-prolil-isomerasas, preferentemente de una chaperona FKBP. Esta molécula de ADN recombinante según la invención codifica un antígeno E1 de rubéola que comprende los aminoácidos 201 a 432, con la condición de que dicho antígeno no presente las secuencias correspondientes a los aminoácidos 143 a 164 y 454 a 481 del antígeno E1 de rubéola maduro, en el que se forma un puente disulfuro entre Cys225 y Cys235 y se forma
45 un segundo puente disulfuro entre Cys349 y Cys352.

Se da a conocer además una molécula de ADN recombinante codificante de un antígeno E1 de rubéola, que comprende por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un antígeno E1 de rubéola, en el que cadena arriba del mismo se encuentra por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de una chaperona de la clase de las peptidil-prolil-isomerasas, preferentemente de una chaperona FKBP. En esta molécula de ADN recombinante, la secuencia de ácidos nucleicos codificante del antígeno E1 de rubéola comprende los aminoácidos 169 a 432, con la condición de que dicho antígeno no presente las secuencias correspondientes a los aminoácidos 143 a 164 y 454 a 481 del antígeno E1 de rubéola nativo, en el que:

- 55 a) se forma un puente disulfuro entre Cys176 y Cys185 y se forma un segundo puente disulfuro entre Cys225 y Cys235, o
b) se forma un puente disulfuro entre Cys176 y Cys185 y se forma un segundo puente disulfuro entre Cys349 y Cys352, o
c) se forma un puente disulfuro entre Cys176 y Cys185 y se forma un segundo puente disulfuro entre Cys368 y Cys401.
60

Las prolil-isomerasas pueden comprender diferentes subunidades o módulos de función diferente, por ejemplo un módulo que muestre actividad catalítica y un módulo que muestra actividad de chaperona o de unión. Dichos

elementos modulares de la familia de FKBP son FkpA, SlyD y un factor desencadenante. En una realización preferente, la invención se refiere a una molécula de ADN recombinante, caracterizada porque el ácido nucleico codificante del chaperón FKBP se selecciona de entre el grupo que consiste de FkpA, SlyD y factor desencadenante.

5 No siempre resulta necesario utilizar la secuencia completa de una chaperona molecular. También pueden utilizarse fragmentos funcionales de las chaperonas (denominados módulos) que todavía presentan las estructuras, funciones y estabilidades deseadas (ver el documento WO n° 98/13496).

10 La variante de FkpA utilizada como herramienta de expresión según la presente invención no presenta su secuencia de señal N-terminal. Un pariente próximo de FkpA llamado SlyD consiste de un dominio N-terminal estructurado responsable de las funciones catalíticas y de chaperona y de un extremo C-terminal en gran parte no estructurado que es excepcionalmente rico en residuos de histidina y de cisteína. El documento WO n° 03/000878 da a conocer que una variante truncada C-terminalmente de SlyD que comprende los aminoácidos 1 a 165 ejerce efectos
15 excepcionalmente positivos sobre la expresión eficiente y la sobreproducción de proteínas diana. Al contrario que en SlyD de tipo salvaje (que incluye seis residuos de cisteína reactivos en un ambiente presumiblemente no estructurado), el riesgo de una reorganización de disulfuros perjudicial que conduzca a especies de proteína incorrectamente conectadas, abortivas y con tendencia a la agregación, se evita con éxito en la variante truncada de SlyD (1-165*), tal como se da a conocer en el documento WO n° 03/000878. Scholz et al. (Biochemistry 45:20-33, 2006) describen proteínas SlyD de diferentes especies que muestran elevadas actividades de prolil-isomerasa y de chaperona, que también pueden utilizarse como herramientas de expresión. Una molécula de ADN recombinante que comprende un antígeno E1 de rubéola con una región que comprende los dos puentes disulfuro tal como se ha indicado anteriormente y un SlyD truncado (1-165*) representa una realización preferente de la presente invención. Una realización preferente adicional es la utilización de chaperonas SlyD en tándem. Preferentemente, se fusionan dos chaperonas SlyD (1-165*) en tándem con el extremo N-terminal de E1 de rubéola (ver también el Ejemplo 1).

En un modo preferente de diseño de un antígeno E1 de rubéola según la presente invención no se incluyen péptidos de señal de posiblemente parejas de fusión periplásmicas. Se ha encontrado que los sistemas de expresión según la presente invención resultan más ventajosos cuando funcionan como sistema de expresión citosólico. Cuanto más
30 eficientes es esta expresión citosólica, más inevitable es la acumulación del polipéptido de fusión diana en cuerpos de inclusión insolubles e inactivos. Habitualmente, las estrategias de expresión y sobreproducción presentan como objetivo la producción soluble en el citosol bacteriano mediante el bloqueo de la formación de cuerpos de inclusión. El enfoque adoptado según la invención es bastante diferente en la medida en que se favorece una sobreproducción citosólica masiva, seguido de un protocolo de renaturalización que facilita rendimientos elevados de proteína antigénica plegada de tipo nativo (es decir, bien estructurada, de plegamiento similar al nativo). Se produce una gran cantidad de antígeno E1 de rubéola y se acumula en cuerpos de inclusión, aunque las proteínas E1 de rubéola recombinantes según la presente invención resultan muy fáciles de manipular, por ejemplo resultan fáciles de solubilizar y replegar en una conformación funcional (es decir, antigénica).

40 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 rubéola y dicha secuencia codificante de una chaperona FKBP. Tal como es conocido de la técnica, dicho polipéptido conector se diseña de la manera más apropiada para la aplicación deseada, especialmente en términos de longitud, flexibilidad, carga e hidrofobicidad. Además, dicha secuencia de ADN codificante de un conector puede ser un sitio de corte proteolítico para la proteína expresada. Dicha secuencia de ADN también puede servir como policonector, es decir, puede proporcionar múltiples sitios de restricción de ADN para facilitar la fusión de los fragmentos de ADN codificantes de un antígeno E1 de rubéola y un dominio de chaperona. Tras la expresión y purificación de la proteína de fusión obtenida y el replegamiento posterior en una conformación soluble e inmunorreactiva, el policonector puede también facilitar la liberación de la proteína E1 de rubéola respecto del complejo de proteína de fusión.

Puede extraerse con precisión del constructo de fusión un antígeno E1 de rubéola soluble y variantes de esta proteína según la presente invención, rindiendo de esta manera el antígeno E1 de rubéola solo, que comprende los aminoácidos 201 a 432 y que se caracteriza porque no presente por lo menos la región transmembranal C-terminal y el segmento de anclaje (aminoácidos 453 a 481), así como por lo menos el segmento entre los aminoácidos 143 y 164 en la parte intermedia de la molécula. El antígeno contiene además una región que comprende dos enlaces disulfuro, es decir, la región entre el enlace disulfuro Cys225-Cys235 y Cys349-Cys352. También se da a conocer la región entre el enlace disulfuro Cys225-Cys235 y Cys368-Cys401, o la región entre el enlace disulfuro Cys176-Cys185 y Cys225-Cys235, o la región entre el enlace disulfuro Cys176-Cys185 y Cys349-Cys352, o la región entre el enlace disulfuro Cys176-Cys185 y Cys368-Cys401.

Un objeto 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 rubéola.

5 Una proteína de fusión que comprenda por lo menos dos dominios chaperonas FKBP y una proteína diana o dominio de antígeno 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 rubéola. La fusión de dos dominios chaperonas FKBP proporciona una mejor solubilidad a la proteína E1 de rubéola.

10 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 de fusión de chaperona E1 de rubéola contiene por lo menos dos y como máximo cuatro secuencias codificantes de una chaperona.

15 La molécula de ADN puede diseñarse para que comprenda ambas secuencias de ADN codificantes de la chaperona FKBP cadena arriba de la proteína diana. Alternativamente, los dos dominios FKBP puede disponerse en forma de sándwich en torno a la proteína diana. Una molécula de ADN recombinante que comprenda ambos dominios FKBP cadena arriba de la secuencia codificante del antígeno E1 de rubéola representa una realización preferente según la presente invención. Con el fin de incrementar la estabilidad genética del sistema de expresión y evitar la recombinación homóloga en la célula huésped, pueden utilizarse diferentes secuencias de nucleótidos para codificar secuencias chaperonas idénticas fusionadas con la molécula diana. En términos simples, las secuencias codificantes de todos los elementos repetitivos en la estructura proteica (tales como las fusiones de chaperona en tándem o segmentos repetitivos de conector y similares) deben variarse, de manera que el uso de codones del sistema de codones del huésped respectivo debe ser tomado en consideración. Ello se consigue fácilmente aprovechando la degeneración del código genético, la cual es bien conocido del experto en el campo de la tecnología de proteínas.

20 En una realización alternativa de la invención, la molécula de ADN recombinante se caracteriza porque una secuencia codificante de una chaperona peptidil-prolil-isomerasas se encuentra situada cadena arriba del antígeno E1 de rubéola y la otra secuencia codificante de una chaperona peptidil-prolil-isomerasa se encuentra situada cadena abajo de la secuencia codificante del antígeno E1 de rubéola.

25 El constructo de ADN que comprende dos dominios chaperonas, así como una secuencia codificante del antígeno E1 de rubéola, preferentemente también contiene dos péptidos conectores de 10 a 100 aminoácidos entre estos dominios. Con el fin de permitir una clonación sistemática, las secuencias de nucleótidos codificantes de estas dos secuencias peptídicas de conector preferentemente son diferentes. Esta diferencia de las secuencias de nucleótidos no resulta necesariamente en una diferencia entre las secuencias de aminoácidos de los péptidos conectores.

30 En los casos en que se desee la liberación de una chaperona o de la totalidad de ellas de una proteína de fusión según la presente invención, el péptido conector se construye para que incluya un sitio de corte proteolítico. Tal como se ha indicado anteriormente, el sitio de corte proteolítico también puede actuar de policonector, es decir, puede proporcionar múltiples sitios de restricción del ADN para facilitar la fusión de los fragmentos de ADN codificantes de un antígeno E1 de rubéola y un dominio de chaperona. Una molécula de ADN recombinante codificante de una proteína de fusión que comprende por lo menos una secuencia polipeptídica codificante del antígeno E1 de rubéola, que comprende 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 desencadenante, y que además comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un conector peptídico que comprende un sitio de corte proteolítico, representa una realización adicional de la presente invención.

35 Un aspecto adicional de la invención es un vector de expresión que comprende operablemente ligada 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 un antígeno E1 de rubéola y cadena arriba de la misma por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de una chaperona peptidil-prolil-isomerasa, preferentemente una chaperona FKBP, en la que la chaperona FKBP se selecciona de entre FkpA, SlyD y factor desencadenante, ha demostrado ser muy ventajoso.

40 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 no celular 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.

45 Los vectores de expresión y clonación probablemente contienen 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 incluido en otra secuencia polinucleótida cointroducida en la célula huésped. Sólo aquellas células huésped que expresan el gen marcador sobrevivirán y crecerán bajo las condiciones selectivas. Entre los genes de selección típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, aquellos que codifican 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 de medios complejos. La elección del marcador seleccionable apropiado dependerá de la célula huésped y los marcadores apropiados para diferentes huéspedes son conocidos de la técnica.

Los vectores que contienen el antígeno E1 de rubéola 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 limitarse a ellos, la transfección con cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, otras sustancias, y la infección por virus. Pueden prepararse grandes cantidades de la proteína E1 de rubéola de la presente invención mediante la expresión de los polipéptidos de la presente invención mediante vectores u otros vehículos de expresión en células huésped compatibles.

La construcción de un vector según la presente invención utiliza técnicas de ligación convencionales. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se cortan, se adaptan o se religan en la forma deseada para generar los plásmidos que se requieren. Si se desea, se lleva a cabo un análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos construidos, de una manera conocida. Los métodos adecuados para construir vectores de expresión, para preparar transcritos in vitro, para introducir ADN en las células huésped, y para llevar a cabo análisis para evaluar la expresión y función, son conocidos por el experto en la materia. La presencia, amplificación y/o expresión génicas pueden medirse en una muestra directamente, por ejemplo mediante transferencia southern convencional, transferencia northern para cuantificar la transcripción en ARNm, transferencia por puntos (análisis de ADN o ARN), o la hibridación in situ, utilizando una sonda apropiadamente marcada que puede estar basada en una secuencia proporcionada en la presente memoria. El experto en la materia contemplará fácilmente cómo pueden modificarse dichos métodos, si se desea.

La invención se refiere además a una célula huésped transformada con dicho vector de expresión.

También se encuentra contemplado un método para producir un antígeno E1 de rubéola soluble e inmunorreactivo, preferentemente en forma de proteína de fusión que contiene el antígeno E1 y una chaperona de la clase de las peptidil-prolil-isomerasas. Preferentemente la isomerasa peptidil-prolil-isomerasa es una chaperona FKBP, más preferentemente una chaperona FKBP seleccionada de entre el grupo que consiste de SlyD, FkpA y factor desencadenante. Este método comprende las etapas siguientes:

- a) cultivar células huésped transformadas con el vector de expresión anteriormente indicado, que contiene un gen codificante de una proteína de fusión que comprende el antígeno E1 de rubéola y una chaperona de la clase de la peptidil-prolil-isomerasa o un fragmento funcional de la misma, que todavía presenta la actividad de unión de chaperona,
- b) la expresión del gen codificante de dicha proteína de fusión,
- c) la purificación de dicha proteína de fusión,
- d) el repliegamiento en una conformación soluble e inmunorreactiva (es decir, antigénica).

La presente invención da a conocer un método para la detección de anticuerpos anti-rubéola en una muestra humana aislada, en la que el antígeno E1 de rubéola se utiliza como pareja de unión para los anticuerpos. De esta manera, la invención se refiere a un método para la detección de anticuerpos específicos para la rubéola en una muestra aislada, comprendiendo dicho método:

- a) formar una mezcla de inmunorreacción mediante la mezcla de una muestra de líquido corporal con antígeno E1 de rubéola según la invención,
- b) mantener dicha mezcla de inmunorreacción durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los anticuerpos contra dicho antígeno E1 de rubéola presente en la muestra de líquido corporal inmunorreacten con dicho antígeno E1 de rubéola formando un producto de inmunorreacción, y
- c) detectar la presencia de cualquiera de dichos productos de inmunorreacción.

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

Con respecto a los procedimientos diagnósticos, son ventajas claras de una proteína de fusión soluble de antígeno E1 de rubéola, más preferentemente una proteína de fusión soluble de antígeno E1 de rubéola-chaperona según la presente invención, por ejemplo, la solubilidad y estabilidad incrementadas de la proteína E1 de rubéola bajo condiciones de tampón fisiológico y la constancia concomitante de la sensibilidad diagnóstica, el número incrementado de epítomos conformacionales de tipo nativo accesibles, la posibilidad de marcar con facilidad un antígeno E1 de rubéola correctamente plegado y la consistencia entre lotes en el procedimiento de fabricación.

La detección de anticuerpos específicos de una clase determinada de inmunoglobulina puede llevarse a cabo mediante la captura de la inmunoglobulina en una fase sólida en la que se ha inmovilizado un antígeno específico. La inmunoglobulina capturada posteriormente es detectada por un anticuerpo marcado específico para inmunoglobulinas humanas de una determinada clase. Sin embargo, este formato de ensayo indirecto sólo puede ponerse en práctica en un diseño de dos etapas que permita una etapa de lavado para eliminar las inmunoglobulinas no específicas antes de la detección. Un formato de ensayo de una etapa, que se lleva a cabo con frecuencia en los analizadores de inmunoensayo automáticos, requiere el formato de ensayo directo de un sándwich de doble antígeno, es decir, el anticuerpo específico forma un inmunocomplejo ligante de 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 analito anticuerpo unido específicamente. La determinación selectiva de los anticuerpos IgG específicos en presencia de anticuerpos IgM de la misma especificidad en un formato de una etapa de sándwich de doble antígeno requiere estrictamente la utilización de antígenos solubles, monoméricos u oligoméricos definidos, tal como se indica en, por ejemplo, la solicitud de patente europea nº EP 0 944 838.

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

El grupo de marcaje puede seleccionarse de entre cualesquiera grupos de señalización conocidos, tales 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 fracciones de señalización o grupos marcadores son los complejos metálicos luminiscentes, tales como los complejos de rutenio o de europio; enzimas, por ejemplo los utilizados para ELISA o para CEDIA (inmunoensayo de enzima donante clonado), por ejemplo el documento nº EP-A-0 061 888, y los isótopos radioactivos.

Los grupos efectores comprenden, por ejemplo, una pareja de una pareja de unión bioafín. Durante la realización de un ensayo, el grupo efector interactúa específicamente y preferentemente de manera no covalente con la otra pareja de la pareja de unión bioafín. Son ejemplos de parejas de unión adecuadas, 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 elementos preferentes de pareja de unión comprenden hapteno, antígeno y hormona. Resultan especialmente preferentes haptenos tales como digoxina y biotina y análogos de los mismos.

Preferentemente, se utiliza el complejo soluble que comprende un antígeno E1 de rubéola y una chaperona prolil-peptidil-isomerasa en un inmunoensayo para la detección de anticuerpos anti-rubéola, es decir, anticuerpos específicos para la rubéola. En una realización preferente adicional, se utiliza un complejo soluble marcado que comprende un antígeno E1 de rubéola y una chaperona prolil-peptidil-isomerasa en un inmunoensayo para la detección de anticuerpos contra la rubéola. Más preferentemente, el complejo marcado es un complejo intramolecular dentro de un polipéptido recombinante que comprende la chaperona y un antígeno E1 de rubéola.

Los inmunoensayos son bien conocidos por el experto en la materia, así como los métodos para llevar a cabo dichos ensayos y las aplicaciones prácticas y procedimientos. La nueva proteína de fusión soluble de antígeno E1 de rubéola, más preferentemente el nuevo polipéptido de fusión soluble de antígeno E1 de rubéola-chaperona puede utilizarse para mejorar ensayos para la detección de anticuerpos anti-rubéola independientemente del modo de detección (por ejemplo un ensayo de isótopos radioactivos, inmunoensayo radioactivo, ensayo de electroquimioluminiscencia, etc.) o el principio de ensayo (por ejemplo el ensayo de tira de ensayo, el ensayo de tipo sándwich o el ensayo homogéneo, etc.).

Para la detección fiable y precisa de una infección por rubéola, resulta esencial medir el anticuerpo antivírico en muestras de líquido corporal. El complejo soluble según la presente invención permite la detección de anticuerpos anti-rubéola bajo condiciones de tampón fisiológico, es decir, sin necesidad de incluir detergentes que mantengan el antígeno en una forma soluble. La detección de anticuerpos anti-rubéola es una parte imperativa de dichos sistemas

de detección combinados de rubéola. Por lo tanto, en una realización preferente la presente invención se refiere a sistemas de detección de rubéola que comprenden la detección de anticuerpos anti-rubéola basándose en la utilización de una proteína de fusión de antígeno E1 de rubéola, más preferentemente la utilización de una proteína chaperona de antígeno E1 de rubéola.

5 Tal como es conocido de la técnica, los anticuerpos de agentes infecciosos tales como bacterias, hongos o virus, se detectan preferentemente mediante un ensayo realizado según el formato de sándwich de doble antígeno (en ocasiones este formato de ensayo también se denomina formato de puente de doble antígeno debido a que los dos antígenos son puenteados por el analito anticuerpo). En dicho ensayo, se requiere y se utiliza la capacidad de un anticuerpo de unirse a por lo menos dos moléculas diferentes de un antígeno dado con sus dos (IgG, IgE), cuatro (IgA) o 10 (IgM) paratopos.

15 La detección de anticuerpos de líquidos corporales según el concepto de puente puede llevarse a cabo en muchos diseños de ensayo diferentes. Un diseño simple comprende el recubrimiento directo de un antígeno sobre una fase sólida y la utilización del mismo antígeno en una forma marcada para la generación de señal. Bajo las condiciones de ensayo apropiadas, un analito anticuerpo específico en una muestra forma un puente entre el antígeno unido a 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.

20 Las estructuras básicas de "antígeno de fase sólida" y de "antígeno de detección" preferentemente son las mismas. Por ejemplo, puede utilizarse una proteína que comprende uno o varios epítomos (es decir, un antígeno) recubriendo directa o indirectamente una fase sólida. El mismo antígeno unido a un marcaje o marcador se utiliza como antígeno de detección. También resulta posible utilizar antígeno E1 de rubéola similares aunque diferentes y de reactividad inmunológica cruzada en un ensayo de puente de doble antígeno. El requisito esencial para llevar a cabo dichos ensayos es que el epítomo relevante o los epítomos relevantes se encuentren presentes en ambos antígenos. Resulta autoevidente que existen muchas variantes del formato de ensayo de puente de doble antígeno. Dichas variantes comprenden, por ejemplo, el recubrimiento indirecto con un antígeno E1 de rubéola de una fase sólida. Preferentemente se utiliza una pareja de unión específica, más preferentemente el sistema de biotina-estreptavidina (o biotina-avidina) para inmovilizar indirectamente un antígeno de rubéola en una fase sólida. Por otra parte, el antígeno E1 de rubéola utilizado para la detección en dicho sistema puede no portar directamente un marcador (por ejemplo un isótopo radioactivo, enzima, molécula fluorescente, etc.), sino que puede ser indirectamente detectable al portar, por ejemplo, un hapteno (por ejemplo digoxina). Dicha detección indirecta puede llevarse a cabo, por ejemplo, con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado.

35 Por lo tanto, es una realización preferente de la presente invención un inmunoensayo según el concepto de puente de doble antígeno, en el que se utiliza un primer antígeno E1 de rubéola según la presente invención y un segundo antígeno E1 de rubéola según la presente invención.

40 En más detalle, se lleva a cabo un inmunoensayo para la determinación de anticuerpos anti-rubéola según el formato de puente de doble antígeno mediante la incubación de una muestra que contiene los anticuerpos anti-rubéola con dos antígenos E1 de rubéola diferentes, es decir, un primer y un segundo antígenos E1 de rubéola, en la que cada uno de dichos antígenos se une específicamente a dichos anticuerpos anti-rubéola. El primer antígeno puede unirse directa o indirectamente a una fase sólida y preferentemente porta un grupo efector, tal como, por ejemplo, biotina, que es parte de una pareja de unión bioafín. El segundo antígeno porta un marcaje o fracción de señalización. De esta manera se forma una mezcla de inmunorreacción. Se añade una fase sólida en la que puede inmovilizarse el primer antígeno, antes de la adición de la muestra a dichos antígenos o, preferentemente, después de formar la mezcla de inmunorreacción. Esta mezcla de inmunorreacción se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los anticuerpos anti-rubéola contra dichos antígenos E1 de rubéola en la muestra de líquido corporal inmunorreacten con dichos antígenos E1 de rubéola formando un producto de inmunorreacción. En la posterior etapa de separación, se separa la fase líquida de la fase sólida. Finalmente, la presencia de cualquiera de dichos productos de inmunorreacción se detecta en la fase sólida o líquida, o en ambas.

55 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 rubéola como antígeno de captura y se utiliza un segundo complejo de proteína de fusión de antígeno E1 de rubéola como antígeno de detección.

60 El complejo de proteína de fusión de antígeno E1 de rubéola, preferentemente el complejo de antígeno E1 de rubéola-chaperona tal como se da a conocer en la presente invención, no sólo produce una solubilidad mejorada de diversas proteínas que de otra manera resultarían difíciles de manipular (tales como E1 de rubéola), sino que también facilita un inmunoensayo según el concepto de puente de doble antígeno de una manera ventajosa.

5 Resulta una característica especialmente atractiva de dicho inmunoensayo según el concepto del puente de doble
 10 antígeno que ahora resulta posible utilizar chaperonas diferentes aunque funcionalmente equivalentes para la
 formación de complejos con el antígeno unido a fase sólida y para la formación de complejos con el antígeno de
 detección, respectivamente. Dicha modificación de un ensayo reduce adicionalmente el problema omnipresente de
 la unión no específica debido a las reactividades inmunológicas cruzadas. Los anticuerpos en una muestra que son
 reactivos con una chaperona y que de esta manera podrían inducir una señal positiva falsa, encuentran dificultades
 para formar un puente en cuanto se utilizan diferentes chaperonas para solubilizar el antígeno en fase sólida y el
 antígeno de detección, respectivamente. Por lo tanto, en este modo de la invención, se reduce mucho la
 probabilidad de una señal positiva debida a una unión no específica. En una realización preferente, por lo tanto,
 15 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 complejos de chaperona-antígeno
 E1 de antígeno difieren entre sí. Preferentemente, la primera y la segunda chaperonas se originan de diferentes
 chaperonas FKBP. En una realización preferente de la presente invención, se utiliza una proteína de fusión SlyD-E1
 por una parte y una proteína de fusión FkpA-E1 por la otra, en un inmunoensayo de tipo sándwich de doble
 20 antígeno. Las chaperonas FKBP preferentes se originan a partir de *Escherichia coli*, *Treponema pallidum*,
Pasteurella multocida, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Thermus thermophilus* y *Thermococcus* sp.

20 Las reacciones inmunológicas cruzadas mediante las partes chaperonas de los dos polipéptidos de fusión en un
 formato de ensayo de tipo sándwich de doble antígeno induciría falsas señales positivas, comprometiendo de esta
 manera la especificidad del inmunoensayo. La utilización de dos chaperonas diferentes aunque funcionalmente
 equivalentes como parejas de fusión en ambos lados del formato de puente podría reducir este riesgo omnipresente
 de reactividad cruzada en los inmunoensayos. La expresión "diferentes chaperonas" puede referirse a la estrategia
 de utilizar chaperonas homólogas (es decir, relacionadas) de diferentes organismos, así como chaperonas diferentes
 del mismo organismo. Sin embargo, además de utilizar diferentes parejas de fusión de chaperona para los antígenos
 25 utilizados en ambos lados de un ensayo de tipo sándwich de doble antígeno, todas las fracciones y neoepítomos que
 no constituyen una parte del antígeno mismo deberían representarse en un componente anti-interferencia
 polimerizado soluble que se añade al ensayo en cantidades suficientes. Una sustancia anti-interferencia podría
 comprender, por ejemplo, una molécula SlyD en tándem que incluya cualesquiera secuencias de conector,
 espaciador y etiqueta que también formen parte del polipéptido chaperona-antígeno. Incluso puede comprender la
 fracción de marcaje en una forma inactiva, es decir, puede comprender una fracción de marcaje mimética sin apagar
 30 las señales positivas verdaderas.

35 Lo mismo es cierto para la fracción de unión que media en la inmovilización en la fase sólida: un mimético de esta
 fracción de unión que ya no es competente para la unión debido a modificaciones químicas, también puede estar
 contemplado en el diseño de una sustancia anti-interferencia. Esta sustancia anti-interferencia podría polimerizarse
 mediante entrecruzadores químicos y, como polímero soluble, añadirse a la mezcla de reacción con el fin de
 capturar inmunoglobulinas de cualquier tipo dirigidas contra cualquier fracción del polipéptido antígeno que no es
 parte de la proteína vírica genuina utilizada para la detección de anticuerpos, por ejemplo la proteína E1 de rubéola
 40 en el inmunodiagnóstico de la rubéola. La elevada densidad de epítomos de la sustancia anti-interferencia
 químicamente polimerizada garantizaría la unión y eliminación eficientes de las moléculas de IgM que son reactivas
 con, por ejemplo, epítomos de chaperona, conector, espaciador o marcaje y que, de esta manera, son una causa
 frecuente de interferencias en los inmunoensayos.

45 La mayoría de las chaperonas que han sido mejor caracterizadas han sido aisladas a partir de *Escherichia coli*, que
 es 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.
 Tal como se ha indicado anteriormente, con el fin de reducir la probabilidad de reacciones positivas falsas causadas
 por dichos anticuerpos, resulta preferente utilizar una pareja de chaperona prolil-peptidil-isomerasa derivada de
 50 diferentes especies bacterianas, por ejemplo una chaperona de un organismo mesofílico y una chaperona de un
 organismo termofílico. En una realización preferente adicional, la chaperona se deriva de bacterias extremofílicas,
 especialmente del grupo de bacterias que comprende *Thermatoga maritima*, *Aquifex aeolicus*, *Thermococcus* sp.,
Methanococcus thermolithotrophicus, *Methanococcus jannaschii*, *Pyrococcus Horikoshii*, *Aeropyrum pernix* y
Thermus thermophilus.

55 La utilización de un complejo de chaperona-antígeno en un inmunoensayo en general, y preferentemente en un
 inmunoensayo según el concepto de puente, proporciona además la posibilidad de derivatizar específicamente la
 chaperona de dicho complejo sin modificar el antígeno mismo. Resulta evidente que la modificación de una proteína
 mediante cualquier fracción química, por ejemplo el acoplamiento de un marcaje a dicha molécula, plantea el riesgo
 de influir negativamente sobre el polipéptido. Por ejemplo, el epítomo investigado puede resultar alterado y, de esta
 60 manera, comprometido, o la unión no específica puede resultar favorecida por dicho marcaje, o pueden generarse
 neoepítomos que interfieran con la especificidad del inmunoensayo. Según la presente invención, ahora resulta
 posible derivatizar específicamente la chaperona dentro de un complejo de antígeno E1 de rubéola-chaperona.

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

- 5 En una realización preferente adicional, se lleva a cabo un inmunoensayo según el concepto de puente, que se caracteriza además porque el segundo complejo de antígeno E1 de rubéola-chaperona utilizado como antígeno de captura comprende un grupo marcador o fracción de señalización.

10 La presente invención se refiere además a la utilización de por lo menos un antígeno E1 de rubéola que contiene dos puentes disulfuro en un ensayo diagnóstico para la detección de anticuerpos anti-rubéola. La invención se refiere además a la utilización de una composición que comprende por lo menos dos antígenos E1 de rubéola diferentes, cada uno de los cuales contiene dos puentes disulfuro, en un ensayo diagnóstico para la detección de anticuerpos anti-rubéola. Los usos y ensayos dados a conocer comprenden la adición de aditivos comunes adicionales según se requiera y sea bien conocido de la técnica.

15 Un objeto adicional de la invención es un kit de reactivos para la detección de anticuerpos contra la rubéola, que contiene por lo menos uno de los antígenos E1 de rubéola adecuado para la unión específica a los anticuerpos de rubéola que deben determinarse y posiblemente porta un marcaje. El kit puede contener otros aditivos habituales en caso necesario. En particular, el kit de reactivos contiene un antígeno E1 de antígeno que comprende los aminoácidos 201 a 432, con la condición de que dicho antígeno no presente las secuencias correspondientes a los aminoácidos 143 a 164 y 454 a 481 del antígeno E1 de rubéola nativo y contenga dos puentes disulfuro, en el que:

- 20 a) se forma un puente disulfuro entre Cys225 y Cys235 y se forma un segundo puente disulfuro entre Cys349 y Cys352, o
 b) se forma un puente disulfuro entre Cys225 y Cys235 y se forma un segundo puente disulfuro entre Cys368 y Cys401, o en el que el antígeno a) es más preferente.

25 Un kit de reactivos adicionalmente descrito contiene por lo menos un antígeno E1 de rubéola que comprende los aminoácidos 169 a 432, con la condición de que dicho antígeno no presente las secuencias correspondientes a los aminoácidos 143 a 164 y 454 a 481 del antígeno E1 de rubéola nativo y contenga dos puentes disulfuro, en el que:

- 30 a) se forma un puente disulfuro entre Cys176 y Cys185 y se forma un segundo puente disulfuro entre Cys225 y Cys235, o
 b) se forma un puente disulfuro entre Cys176 y Cys185 y se forma un segundo puente disulfuro entre Cys349 y Cys352, o
 35 c) se forma un puente disulfuro entre Cys176 y Cys185 y se forma un segundo puente disulfuro entre Cys368 y Cys401.

40 En todavía otra realización de la invención el kit de reactivos contiene una composición que comprende por lo menos dos antígenos E1 de rubéola diferentes, cada uno de los cuales comprende los aminoácidos 201 a 432, con la condición de que cada uno de dichos antígenos no presente secuencias correspondientes a los aminoácidos 143 a 164 y 454 a 481 del antígeno E1 nativo de rubéola y en los que cada uno de los como mínimo dos antígenos E1 de rubéola contienen dos puentes disulfuro.

45 Además, cada uno de los kits de reactivos dados a conocer anteriormente contiene soluciones de control y estándar, así como reactivos en una o más soluciones con los aditivos, tampones, sales, detergentes, etc. comunes utilizados por el experto en la materia.

50 Una realización adicional es la utilización de los antígenos E1 de rubéola según la invención como vacunas. La preparación de vacunas que contienen un polipéptido inmunogénico como ingrediente activo es conocida de la técnica. Dichas vacunas se preparan comúnmente como inyectables, en forma de soluciones o suspensiones líquidas. El ingrediente activo, es decir, el antígeno E1 de rubéola o su proteína de fusión se mezcla con excipientes que resultan farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo, tales como agua, tampones fisiológicos acuosos, solución salina, dextrosa, glicerol y etanol. Las vacunas convencionalmente se administran mediante inyección.

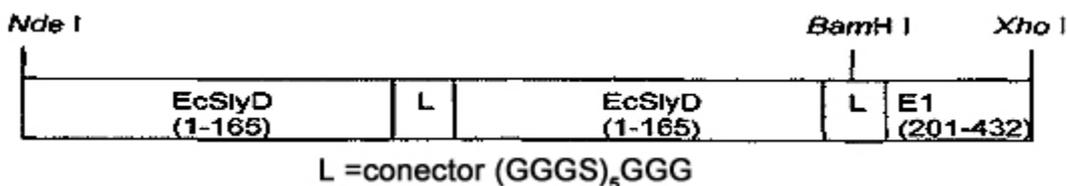
55 La sección de Ejemplo ilustra la invención.

Ejemplo 1

60 **Construcción de un plásmido de expresión que comprende en su secuencia el fragmento de ectodominio E1 de E1 de rubéola (201-432) y (169-432)**

La secuencia de la proteína precursora de E1 de la cepa Therien de la rubéola (Domínguez et al., Virology 177:225-238, 1990) se obtuvo de la base de datos SwissProt (nº de acc. P07566). Se obtuvo un gen sintético codificante de E1 de rubéola (aa 1 a 432) de Medigenomix (Martinsried, Alemania).

5 El ectodominio E1 de rubéola contiene 20 cisteínas. Esta complejidad de disulfuros es un obstáculo importante a la producción recombinante simple del ectodominio E1 de rubéola en huéspedes procarióticos tales como *E. coli*. Veinte residuos de cisteína dentro del ectodominio incrementan drásticamente la probabilidad de apareamiento incorrecto de disulfuros, lo que habitualmente conduce a conformaciones de proteína incorrectamente plegadas y con tendencia a la agregación. Para reducir la complejidad de disulfuros, se utilizó una variante en la que todos los
10 residuos de cisteína se habían mutado a alanina o serina. Partiendo de esta variante de E1 sin disulfuros, se obtuvieron dos grandes variantes de E1 solubles y monoméricas: los fragmentos 201-432 y 169-432 de E1 de rubéola, respectivamente. A continuación, se introdujeron parejas de disulfuros, en primer lugar individualmente y después en combinaciones de dos o tres, en los fragmentos de E1. Al final, sólo se introdujeron las cisteínas necesarias para la formación de disulfuro mediante mutagénesis sitio-dirigida, mientras que todos los demás
15 residuos de cisteína seguían mutados en alanina. Se utilizaron las técnicas de PCR de QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA, USA) y estándares para generar mutaciones puntuales, variantes por delección y extensión, o sitios de restricción en los casetes de expresión respectivos. Basándose en el plásmido de expresión pET24a de Novagen (Madison, WI, USA), se llevaron a cabo las etapas de clonación siguientes. El vector se digirió con *Nde*I y *Xho*I y se insertó un casete semisintético que comprendía en tándem SlyD y el fragmento 201-432 ó 169-432 de E1 de rubéola, respectivamente. Todas las variantes del polipéptido de fusión de E1 recombinante contenían una etiqueta hexahistidina C-terminal para facilitar la purificación y replegamiento asistidos por Ni-NTA. El dibujo a continuación muestra un esquema del antígeno E1 201-432 de rubéola resultante con dos chaperonas SlyD en tándem fusionadas con su extremo N-terminal.



25 La inserción del plásmido resultante se secuenció y se encontró que codificaba la proteína de fusión deseada. Las secuencias de aminoácidos de los antígenos E1 de rubéola insertados se muestran en el listado de secuencias de la presente invención.

30 Mediante la utilización de esta estrategia se obtuvieron los antígenos E1 de rubéola siguientes, con una parte SlyD en tándem respecto a sus extremos N-terminales:

35 Ningún puente disulfuro (como variante de E1 de referencia sin ningún residuo de cisteína)
 E1 169-432 tal como se muestra en SEC ID nº 2
 E1 201-432 tal como se muestra en SEC ID nº 1
 SEC ID nº 1 (201-432) y 2 (169-432) muestra la secuencia de aminoácidos de E1 de rubéola (cepa Therien) como accesible en la base de datos SwissProt ID P07566.

40 Puentes disulfuro individuales:
 E1 169-432 (C11-C12),
 E1 201-432 (C13-C14),
 E1 201-432 (C17-C18),
 E1 201-432 (C19-C20)

45 Puentes disulfuro dobles:
 E1 201-432 (C17-C18, C19-C20) tal como se muestra en SEC ID nº 3
 E1 201-432 (C13-C14, C17-C18) tal como se muestra en SEC ID nº 4
 E1 201-432 (C13-C14, C19-C20) tal como se muestra en SEC ID nº 5
 50 E1 169-432 (C11-C12, C13-C14) tal como se muestra en SEC ID nº 6
 E1 169-432 (C11-C12, C17-C18) tal como se muestra en SEC ID nº 7
 E1 169-432 (C11-C12, C19-C20) tal como se muestra en SEC ID nº 8

55 Puentes disulfuro triples:
 E1 201-432 (C13-C14, C17-C18, C19-C20) tal como se muestra en SEC ID nº 11
 E1 169-432 (C11-C12, C17-C18, C19-C20) tal como se muestra en SEC ID nº 9.

Los resultados experimentales de reactividad inmunológica de estos antígenos E1 de rubéola en un inmunoensayo para la detección de anticuerpos anti-rubéola tal como se describe en los Ejemplos 6 y 7 se muestran en las Tablas 1 a 4. Observar que las Tablas 3 y 4 se muestran como las figuras 3 y 4, respectivamente.

5 Basándose en la estrategia proporcionada en el ejemplo, también puede obtenerse el constructo siguiente:

Puentes disulfuro triples:

E1 169-432 (C11-C12, C13-C14, C17-C18) tal como se muestra en SEC ID nº 10.

10 Ejemplo 2

Purificación y replegamiento acoplados de la proteína de fusión SS-E1 (201-432 y 169-432)

15 Todas las proteínas de fusión de E1-chaperona se purificaron y replegaron esencialmente según protocolos idénticos. Se cultivaron células de *E. coli* BL21 (DE3) que portaban el plásmido de expresión en medio LB más canamicina (30 µg/ml) hasta una DO_{600} 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 células mediante centrifugación (20 min a 5.000xg), 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 para completar la lisis celular durante dos horas. Tras la centrifugación y la filtración, el lisado se aplicó en una columna de Ni-NTA (níquel-nitrilotriacetato) preequilibrada en el tampón de lisis anteriormente indicado. Con el fin de evitar el puentado de disulfuros prematuro y la reorganización de disulfuros, se incluyó TCEP 5 mM en el tampón de lavado como agente reductor que es compatible con las columnas de quelato metálico. Tras una etapa de lavado del exceso (>20 volúmenes de columna de tampón de lisis + TCEP), se desplazó el tampón de lisis caotrópico 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 matriz (se aplicaron por lo menos 10 volúmenes de columna de tampón de replegamiento para asegurarse de que no quedaba GuHCl residual a concentraciones caotrópicas). A continuación se indujo el plegamiento oxidativo (es decir, el puentado oxidativo de los residuos de cisteína) mediante el lavado con fosfato sódico 50 mM, pH 7,8, cloruro sódico 100 mM. Debido a la elevada concentración eficaz de iones divalentes Ni^{2+} , la formación de puentes disulfuro dentro de la proteína de fusión unida a matriz es un proceso muy rápido. Antes de 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 proteína para su pureza (>95% según la SDS-PAGE) y se agruparon. Finalmente, la proteína se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño y se agrupó la fracción de dímero aparente, se concentró y se evaluaron sus propiedades espectroscópicas.

40 Ejemplo 3

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

45 Se modificaron los grupos ε-amino de la lisina de los ectodominios de rubéola recombinantes a concentraciones de proteína de ~10 mg/ml con biotina activada con N-hidroxi-succinimida y marcajes de rutenio, respectivamente. La proporción molar de marcaje/proteína varió entre 1: 1 y 5:1, según 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 pasando el conjugado de proteína en bruto por una columna de filtración en gel (Superdex 200 HI Load).

50 Ejemplo 4

Evaluación de la reactividad inmunológica de la proteína de fusión de E1 de rubéola recombinante SS-E1 (aminoácidos 201 a 432) en un ensayo inmunodiagnóstico; detección de anticuerpos Ig G anti-rubéola en suero humano

55 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 tipo 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 de estreptavidina, mientras que el antígeno de detección portaba un catión de rutenio acoplado a modo de fracción de señalización. La detección de señales en Elecsys® 2010 se basó en la electroquimioluminiscencia.

En presencia de un analito inmunoglobulina específico, el complejo de rutenio cromogénico se puentó con la fase sólida y emitió luz a 620 nm tras la excitación en un electrodo de platino. La salida de señal se expresa en unidades de luz arbitrarias. Las mediciones se llevaron a cabo con muestras positivas para IgG anti-rubéola procedentes de paneles de sueros de la Cruz Roja Bávara.

5

Ejemplo 5

Análisis de FPLC (análisis de cromatografía líquida rápida de proteínas)

Aparte de su antigenicidad, el estado oligomérico, la solubilidad y la estabilidad de la proteína de fusión SS-E1 determinan su idoneidad para fines diagnósticos. Para la optimización de la longitud, las variantes sin cisteínas de los N-fragmentos de E1 (aminoácidos 1 a 314) y los C-fragmentos (aminoácidos 315-432) se clonaron, se expresaron y se purificaron (como proteínas de fusión con SlyD* en tándem). Con el fin de elucidar el estado oligomérico aparente de los fragmentos de ectodominio de rubéola recombinantes, los N-fragmentos y C-fragmentos de E1 de rubéola fueron sometidos a filtración analítica en gel en una columna Superdex 200 HR 10/30. El tampón de migración era fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, KCl 100 mM. Se aplicaron aproximadamente 200 ml de la solución de SS-E1 (concentración de proteína: ~1,0 mg/ml) en una columna de SEC, y se realizó un seguimiento de la elución a partir de la absorción a 280 nm. La totalidad de los N-fragmentos de E1 1-55, 1-104, 1-133 y 1-142 eluyó en el intervalo de separación de la columna Superdex 200, así como los C-fragmentos de E1 196-432, 201-432, 260-432 y 315-432. Todas las variantes SlyD*-SlyD*-E1 eluyeron en la posición de aproximadamente dos veces el tamaño molecular esperado, sugiriendo la presencia de dímeros aparentes.

Ejemplo 6

Evaluación de la reactividad inmunológica del C-fragmento 201-432 de E1 de rubéola con disulfuros individuales en un ensayo inmunodiagnóstico; detección de anticuerpos IgG anti-rubéola en suero humano

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 tipo 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 de estreptavidina, mientras que el antígeno de detección portaba un catión de rutenio acomplejado a modo de fracción de señalización. La detección de señales en Elecsys®2010 se basó en la electroquimioluminiscencia. En presencia de un analito inmunoglobulina específico, el complejo de rutenio cromogénico se puentó con la fase sólida y emitió luz a 620 nm tras la excitación en un electrodo de platino. La salida de señal se expresa en unidades de luz arbitrarias. Las mediciones se llevaron a cabo con muestras positivas para IgG anti-rubéola procedentes de paneles de sueros de la Cruz Roja Bávara. Se muestran los resultados en la Tabla 1.

Tabla 1: Detección de anticuerpos IgG anti-rubéola en sueros humanos mediante la utilización de antígeno SS-E1 (aa 201-432) de rubéola que portaba disulfuros individuales o ningún disulfuro

	C13-C14	C17-C18	C19-C20	sin disulfuros
Recuentos medios de sueros negativos para rubéola	2,076	1,453	2,487	2,076
Sueros positivos para rubéola	señal relativa	señal relativa	señal relativa	señal relativa
BRK 01/2003_115	23,55	34,88	17,94	18,17
BRK 01/2003_116	17,09	7,96	5,83	4,37
BRK 01/2003_119	13,47	1,89	5,92	0,94
BRK 01/2003_123	10,30	5,72	6,66	4,10
BRK 01/2003_127	11,82	3,37	2,93	1,82
BRK 01/2003_130	12,81	2,37	1,58	1,46
BRK 01/2003_157	3,09	3,33	2,35	1,73
BRK 01/2003_159	2,31	1,79	1,14	0,91
BRK 01/2003_162	15,34	16,58	11,68	7,70
BRK 01/2003_166	7,12	2,96	1,64	1,44

Los inmunoensayos se llevaron a cabo mediante la utilización de un analizador Elecsys® 2010 tal como se indica en el Ejemplo 6. Las señales relativas se normalizaron respecto al valor medio obtenido para siete muestras negativas para rubéola. Los sueros positivos para rubéola se obtuvieron de la Cruz Roja Bávara, Alemania, y los controles negativos para rubéola se obtuvieron de Trina International Bioreactives AG, Suiza. Todas las variantes de E1 eran proteínas de fusión SlyD*-SlyD* solubles; sus enlaces disulfuro respectivos se indican en la tabla. Todos los sueros

clasificados como positivos se confirmaron como correctos. Resulta evidente a partir de la Tabla 1 que la señal relativa se incrementa considerablemente cuando el antígeno E1 de rubéola contiene un puente disulfuro, mientras que la señal es relativamente baja cuando el antígeno E1 no presenta ningún puente disulfuro. La introducción de un único enlace disulfuro dentro del fragmento E1 201-432 incrementa significativamente la actividad inmunológica, probablemente mediante la estabilización de epítotos conformacionales.

Los inmunoensayos se llevaron a cabo mediante la utilización de un analizador Elecsys® 2010 tal como se indica en el Ejemplo 6. Las señales relativas se normalizaron respecto al valor medio obtenido para siete muestras negativas para rubéola. Los sueros positivos para rubéola se obtuvieron de la Cruz Roja Bávara, Alemania, y los controles negativos para rubéola se obtuvieron de Trina International Bioreactives AG, Suiza. Todas las variantes de E1 eran proteínas de fusión SlyD*-SlyD* solubles; sus enlaces disulfuro respectivos se indican en la tabla. Todos los sueros clasificados como positivos se confirmaron como correctos. Resulta evidente a partir de la Tabla 1 que la señal relativa se incrementa considerablemente cuando el antígeno E1 de rubéola contiene un puente disulfuro, mientras que la señal es relativamente baja cuando el antígeno E1 no presenta ningún puente disulfuro. La introducción de un único enlace disulfuro dentro del fragmento E1 201-432 incrementa significativamente la actividad inmunológica, probablemente mediante la estabilización de epítotos conformacionales, los cuales son importantes para la unión de inmunoglobulinas. Lo anterior es cierto para cada uno de los enlaces disulfuro individuales Cys225-Cys235, Cys349-Cys351 y Cys368-Cys401. Sin embargo, la inmunorreactividad, es decir, la antigenicidad de E1 201-432 de rubéola se incrementa especialmente al restaurar el enlace disulfuro Cys225-Cys235 (C13-C14), lo que probablemente refleja el papel central de este epítoto estabilizado por disulfuro en la inducción de los anticuerpos anti-E1 (ver la Tabla 1).

Ejemplo 7:

Examen de la actividad inmunológica del C-fragmento 201-432 de E1 de rubéola con múltiples combinaciones de disulfuros en un ensayo inmunodiagnóstico; detección de anticuerpos IgG anti-rubéola en sueros humanos

Evaluación de tres variantes diferentes de E1 de rubéola, formando dos puentes disulfuro entre las cisteínas Cys349-Cys352 (C17-C18) y Cys368-Cys401 (C19-C20), tal como es conocido a partir del documento nº EP-A-1780282 (columna izquierda), una variante según la invención que porta dos puentes disulfuro entre las cisteínas Cys225-Cys235 (C13-C14) y Cys349-Cys352 (C17-C18) (columna intermedia) y una variante que contiene tres puentes disulfuro entre las cisteínas, Cys225-Cys235 (C13-C14), Cys349-Cys352 (C17-C18) y Cys368-Cys401 (C19-C20) (columna derecha).

Las mediciones se llevaron a cabo con muestras (del estándar WHO) y muestras positivas para IgG anti-rubéola procedentes de paneles de sueros de la Cruz Roja Bávara. Las mediciones se llevaron a cabo en un analizador automático Elecsys® 2010 (Roche Diagnostics GmbH) utilizando el formato de tipo sándwich de doble antígeno tal como se describe en el Ejemplo 6. Se muestran los resultados en la Tabla 2.

Tabla 2: Detección de anticuerpos IgG anti-rubéola en sueros humanos mediante la utilización de antígeno SS-E1 (aa 201-432) de rubéola portador de combinaciones de dobles y triples disulfuros.

	C17-C18 C19-C20	C13-C14 C17-C18	C13-C14 C17-C18 C19-C20
Recuentos medios de sueros negativos para rubéola		2,830	2,072 4,610
Sueros positivos para rubéola	señal relativa	señal relativa	señal relativa
BRK 01/2003_115	22,77	42,92	22,98
BRK 01/2003_116	33,22	51,67	36,12
BRK 01/2003_119	44,22	89,58	45,90
BRK 01/2003_123	78,60	71,99	73,62
BRK 01/2003_127	37,56	42,14	37,83
BRK 01/2003_130	9,61	28,88	16,24
BRK 01/2003_157	17,87	20,23	16,49
BRK 01/2003_159	14,59	18,92	14,01
BRK 01/2003_162	31,25	53,29	31,06
BRK 01/2003_166	9,16	17,55	11,70

Los inmunoensayos se llevaron a cabo mediante la utilización de un analizador Elecsys® 2010 tal como se describe en los Ejemplos 6 y 7. Las señales relativas se normalizaron respecto al valor medio obtenido para siete muestras negativas para rubéola. Los sueros positivos para rubéola se obtuvieron de la Cruz Roja Bávara, Alemania, y los controles negativos para rubéola se obtuvieron de Trina International Bioreactives AG, Suiza. Todas las variantes de E1 eran proteínas de fusión SlyD*-SlyD* solubles; sus enlaces disulfuro respectivos se indican en la tabla. Todos los sueros clasificados como positivos se confirmaron como correctos.

Tal como puede observarse en la Tabla 2, todas las variantes de E1 son reactivas en el inmunoensayo, es decir, los antígenos se unen específicamente a anticuerpos anti-rubéola en las muestras. Inesperadamente, la actividad inmunológica (es decir, la antigenicidad) se incrementa fuertemente al añadir un segundo enlace disulfuro. Este incremento es cooperativo y no aditivo, es decir, las contribuciones a la señal de las variantes de enlace disulfuro individual no se añaden simplemente para rendir la señal total. Por el contrario, la señal total es significativamente más alta que la suma de las señales individuales generadas por los constructos de enlace disulfuro individual (ver la Tabla 2).

Este marcado incremento de la señal al restaurar los dos puentes disulfuro se mantiene para todas las variantes sometidas a ensayo. Sin embargo, la altura de la señal resulta ser diferente para los dos constructos diferentes con dos disulfuros. Por ejemplo, E1 201-432 con la combinación de enlaces disulfuro Cys225-Cys235 y Cys349-Cys352 (C13-C14 y C17-C18) resulta ser un excelente antígeno, que resulta adecuado para la detección de inmunoglobulinas anti-E1 en sueros humanos (ver la Tabla 2). En 9 de cada 10 muestras esta variante con dos puentes disulfuro según la invención (C13-C14 y C17-C18, columna intermedia) mostraba una señal considerablemente más alta que la variante de doble disulfuro conocida de la técnica anterior (C17-C18 y C19-C20) y la variante de triple disulfuro en la columna derecha. Puede demostrarse que los antígenos E1 de rubéola según la invención resultan adecuados para la utilización como antígenos en un inmunoensayo para la detección de anticuerpos anti-rubéola en una muestra humana.

Descripción adicional de las Tablas 1 y 2 y Tablas 3 (fig. 3) y 4 (fig. 4)

Los resultados mostrados en las Tablas 3 y 4 confirman los resultados de las Tablas 1 y 2, respectivamente, es decir, la señal relativa se incrementa sustancialmente en el caso de que el antígeno E1 de rubéola contenga una combinación de dos puentes disulfuro, mientras que la señal es bastante pobre en el caso de que el antígeno E1 porte únicamente un puente disulfuro o no presente ningún residuo de cisteína en absoluto.

La restauración de un único enlace disulfuro dentro del fragmento 201-432 de E1 (Tabla 3) incrementa ligeramente la actividad inmunológica. Se obtienen los mejores resultados con el enlace disulfuro individual Cys225-Cys235 (C13-C14). La introducción de un enlace disulfuro adicional, en particular la combinación de los puentes disulfuro C17-C18 y C19-C20, así como la combinación de los puentes disulfuro C13-C14 y C17-C18 resulta en un incremento significativo de la señal. Sin embargo, la adición de un tercer puente disulfuro no contribuye adicionalmente de manera significativa a la señal.

La Tabla 4 muestra que la restauración de un único enlace disulfuro Cys176-Cys185 (C11-C12) dentro del fragmento 169-432 de E1 prácticamente no altera la actividad inmunológica. Sin embargo, en combinación con uno de los otros puentes disulfuro, el puente disulfuro C11-C12 incrementa significativamente la señal. El constructo de doble disulfuro respectivo muestra una inmunorreactividad que claramente excede la suma de las reactividades de los constructos de disulfuro individual, lo que es indicativo de un modo cooperativo de acción. Se obtienen los mejores resultados mediante la combinación de los puentes disulfuro C11-C12 y C13-C14, seguido de la combinación del puente disulfuro C11-C12 con C19-C20 y C11-C12 con C17-C18. Además, la combinación de los puentes disulfuro C13-C14 con C19-C20 dentro del antígeno E1 de rubéola conduce a una excelente reactividad inmunológica, tal como reflejan las señales relativas elevadas. También se observa un incremento significativo de la señal al añadir el puente disulfuro individual aparentemente inerte C11-C12 a la combinación de doble disulfuro C17-C18/C19-C20 para rendir el constructo de triple disulfuro C11-C12/C17-C18/C19-C20. Notablemente, la inmunorreactividad de este constructo triple disulfuro de E1 excede la suma de las inmunorreactividades del constructo de disulfuro individual (C11-C12) y de doble disulfuro (C17-C18/C19-C20), lo que es nuevamente indicativo de un modo cooperativo de acción.

En resumen, el puente disulfuro Cys176-Cys185 (C11-C12), considerado por sí solo, no contribuye de manera notable a la reactividad inmunológica (es decir, a la antigenicidad) del antígeno E1 de rubéola. Sin embargo, en cuanto se combina el puente disulfuro individual aparentemente inerte Cys176-Cys185 (C11-C12) con por lo menos uno de los otros puentes disulfuro, esta combinación inesperadamente conduce a un antígeno cooperativamente mejorado de excelente reactividad inmunológica. Las variantes de E1 que portan el puente disulfuro C11-C12 en combinación con el puente disulfuro C13-C14 ó C17-C18 ó C19-C20 o que portan el puente disulfuro C11-C12 en combinación con tanto el puente disulfuro C17-C18 como C19-C20 son excelentes herramientas para la detección de anticuerpos anti-E1 de rubéola en sueros humanos.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Roche Diagnostics GmbH y Hoffmann-La Roche AG
- <120> Nuevas variantes de E1 de rubéola con dos puentes disulfuro
- <130> 24647 EP-IR
- 10 <160> 11
- <170> PatentIn versión 3.2
- 15 <210> 1
- <211> 232
- <212> PRT
- <213> Virus rubéola
- 20 <400> 1

```

Gly Asp Leu Val Glu Tyr Ile Met Asn Tyr Thr Gly Asn Gln Gln Ser
 1          5          10          15

Arg Trp Gly Leu Gly Ser Pro Asn Cys His Gly Pro Asp Trp Ala Ser
          20          25          30

Pro Val Cys Gln Arg His Ser Pro Asp Cys Ser Arg Leu Val Gly Ala
          35          40          45

Thr Pro Glu Arg Pro Arg Leu Arg Leu Val Asp Ala Asp Asp Pro Leu
          50          55          60

Leu Arg Thr Ala Pro Gly Pro Gly Glu Val Trp Val Thr Pro Val Ile
65          70          75          80

Gly Ser Gln Ala Arg Lys Cys Gly Leu His Ile Arg Ala Gly Pro Tyr
          85          90          95

Gly His Ala Thr Val Glu Met Pro Glu Trp Ile His Ala His Thr Thr
          100          105          110

Ser Asp Pro Trp His Pro Pro Gly Pro Leu Gly Leu Lys Phe Lys Thr
          115          120          125

Val Arg Pro Val Ala Leu Pro Arg Thr Leu Ala Pro Pro Arg Asn Val
130          135          140

Arg Val Thr Gly Cys Tyr Gln Cys Gly Thr Pro Ala Leu Val Glu Gly
145          150          155          160

Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asn Cys His Leu Thr Val Asn Gly Glu Asp
          165          170          175
    
```

- <210> 2
- <211> 264
- <212> PRT

ES 2 450 998 T3

<213> Virus rubéola

<400> 2

Leu Ser Val Ala Gly Val Ser Cys Asn Val Thr Thr Glu His Pro Phe
1 5 10 15

Cys Asn Thr Pro His Gly Gln Leu Glu Val Gln Val Pro Pro Asp Pro
20 25 30

Gly Asp Leu Val Glu Tyr Ile Met Asn Tyr Thr Gly Asn Gln Gln Ser
35 40 45

Arg Trp Gly Leu Gly Ser Pro Asn Cys His Gly Pro Asp Trp Ala Ser
50 55 60

Pro Val Cys Gln Arg His Ser Pro Asp Cys Ser Arg Leu Val Gly Ala
65 70 75 80

Thr Pro Glu Arg Pro Arg Leu Arg Leu Val Asp Ala Asp Asp Pro Leu
85 90 95

Leu Arg Thr Ala Pro Gly Pro Gly Glu Val Trp Val Thr Pro Val Ile
100 105 110

Gly Ser Gln Ala Arg Lys Cys Gly Leu His Ile Arg Ala Gly Pro Tyr
115 120 125

5 Gly His Ala Thr Val Glu Met Pro Glu Trp Ile His Ala His Thr Thr

ES 2 450 998 T3

130

135

140

Ser Asp Pro Trp His Pro Pro Gly Pro Leu Gly Leu Lys Phe Lys Thr
145 150 155 160

Val Arg Pro Val Ala Leu Pro Arg Thr Leu Ala Pro Pro Arg Asn Val
165 170 175

Arg Val Thr Gly Cys Tyr Gln Cys Gly Thr Pro Ala Leu Val Glu Gly
180 185 190

Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asn Cys His Leu Thr Val Asn Gly Glu Asp
195 200 205

Leu Gly Ala Val Pro Pro Gly Lys Phe Val Thr Ala Ala Leu Leu Asn
210 215 220

Thr Pro Pro Pro Tyr Gln Val Ser Cys Gly Gly Glu Ser Asp Arg Ala
225 230 235 240

Thr Ala Arg Val Ile Asp Pro Ala Ala Gln Ser Phe Thr Gly Val Val
245 250 255

Tyr Gly Thr His Thr Thr Ala Val
260

<210> 3
<211> 232
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Antígeno E1 de rubéola; varios residuos de Cys sustituidos por Ala

<400> 3

Gly Asp Leu Val Glu Tyr Ile Met Asn Tyr Thr Gly Asn Gln Gln Ser
1 5 10 15

Arg Trp Gly Leu Gly Ser Pro Asn Ala His Gly Pro Asp Trp Ala Ser
20 25 30

Pro Val Ala Gln Arg His Ser Pro Asp Ala Ser Arg Leu Val Gly Ala
35 40 45

Thr Pro Glu Arg Pro Arg Leu Arg Leu Val Asp Ala Asp Asp Pro Leu
50 55 60

ES 2 450 998 T3

Leu Arg Thr Ala Pro Gly Pro Gly Glu Val Trp Val Thr Pro Val Ile
65 70 75 80

Gly Ser Gln Ala Arg Lys Ala Gly Leu His Ile Arg Ala Gly Pro Tyr
85 90 95

Gly His Ala Thr Val Glu Met Pro Glu Trp Ile His Ala His Thr Thr
100 105 110

Ser Asp Pro Trp His Pro Pro Gly Pro Leu Gly Leu Lys Phe Lys Thr
115 120 125

Val Arg Pro Val Ala Leu Pro Arg Thr Leu Ala Pro Pro Arg Asn Val
130 135 140

Arg Val Thr Gly Cys Tyr Gln Cys Gly Thr Pro Ala Leu Val Glu Gly
145 150 155 160

Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asn Cys His Leu Thr Val Asn Gly Glu Asp
165 170 175

Leu Gly Ala Val Pro Pro Gly Lys Phe Val Thr Ala Ala Leu Leu Asn
180 185 190

Thr Pro Pro Pro Tyr Gln Val Ser Cys Gly Gly Glu Ser Asp Arg Ala
195 200 205

Thr Ala Arg Val Ile Asp Pro Ala Ala Gln Ser Phe Thr Gly Val Val
210 215 220

Tyr Gly Thr His Thr Thr Ala Val
225 230

<210> 4
<211> 232
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Antígeno E1 de rubéola con mutaciones; varios residuos de Cys sustituidos por Ala

<400> 4

Gly Asp Leu Val Glu Tyr Ile Met Asn Tyr Thr Gly Asn Gln Gln Ser
1 5 10 15

ES 2 450 998 T3

Arg Trp Gly Leu Gly Ser Pro Asn Cys His Gly Pro Asp Trp Ala Ser
 20 25 30

Pro Val Cys Gln Arg His Ser Pro Asp Ala Ser Arg Leu Val Gly Ala
 35 40 45

Thr Pro Glu Arg Pro Arg Leu Arg Leu Val Asp Ala Asp Asp Pro Leu
 50 55 60

Leu Arg Thr Ala Pro Gly Pro Gly Glu Val Trp Val Thr Pro Val Ile
 65 70 75 80

Gly Ser Gln Ala Arg Lys Ala Gly Leu His Ile Arg Ala Gly Pro Tyr
 85 90 95

Gly His Ala Thr Val Glu Met Pro Glu Trp Ile His Ala His Thr Thr
 100 105 110

Ser Asp Pro Trp His Pro Pro Gly Pro Leu Gly Leu Lys Phe Lys Thr
 115 120 125

Val Arg Pro Val Ala Leu Pro Arg Thr Leu Ala Pro Pro Arg Asn Val
 130 135 140

Arg Val Thr Gly Cys Tyr Gln Cys Gly Thr Pro Ala Leu Val Glu Gly
 145 150 155 160

Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asn Ala His Leu Thr Val Asn Gly Glu Asp
 165 170 175

Leu Gly Ala Val Pro Pro Gly Lys Phe Val Thr Ala Ala Leu Leu Asn
 180 185 190

Thr Pro Pro Pro Tyr Gln Val Ser Ala Gly Gly Glu Ser Asp Arg Ala
 195 200 205

Thr Ala Arg Val Ile Asp Pro Ala Ala Gln Ser Phe Thr Gly Val Val
 210 215 220

Tyr Gly Thr His Thr Thr Ala Val
 225 230

<210> 5
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <220>

10 <223> Antígeno E1 con mutaciones; varios residuos de Cys sustituidos por Ala

ES 2 450 998 T3

<400> 5

Gly Asp Leu Val Glu Tyr Ile Met Asn Tyr Thr Gly Asn Gln Gln Ser
1 5 10 15

Arg Trp Gly Leu Gly Ser Pro Asn Cys His Gly Pro Asp Trp Ala Ser
20 25 30

Pro Val Cys Gln Arg His Ser Pro Asp Ala Ser Arg Leu Val Gly Ala
35 40 45

Thr Pro Glu Arg Pro Arg Leu Arg Leu Val Asp Ala Asp Asp Pro Leu
50 55 60

Leu Arg Thr Ala Pro Gly Pro Gly Glu Val Trp Val Thr Pro Val Ile
65 70 75 80

Gly Ser Gln Ala Arg Lys Ala Gly Leu His Ile Arg Ala Gly Pro Tyr
85 90 95

Gly His Ala Thr Val Glu Met Pro Glu Trp Ile His Ala His Thr Thr
100 105 110

Ser Asp Pro Trp His Pro Pro Gly Pro Leu Gly Leu Lys Phe Lys Thr
115 120 125

Val Arg Pro Val Ala Leu Pro Arg Thr Leu Ala Pro Pro Arg Asn Val
130 135 140

Arg Val Thr Gly Ala Tyr Gln Ala Gly Thr Pro Ala Leu Val Glu Gly
145 150 155 160

Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asn Cys His Leu Thr Val Asn Gly Glu Asp
165 170 175

Leu Gly Ala Val Pro Pro Gly Lys Phe Val Thr Ala Ala Leu Leu Asn
180 185 190

Thr Pro Pro Pro Tyr Gln Val Ser Cys Gly Gly Glu Ser Asp Arg Ala
195 200 205

Thr Ala Arg Val Ile Asp Pro Ala Ala Gln Ser Phe Thr Gly Val Val
210 215 220

Tyr Gly Thr His Thr Thr Ala Val
225 230

5

<210> 6

<211> 264

<212> PRT

<213> Artificial

10

ES 2 450 998 T3

<220>

<223> Antígeno E1 de rubéola con mutaciones; varios residuos de Cys sustituidos por Ala

<400> 6

5

Leu Ser Val Ala Gly Val Ser Cys Asn Val Thr Thr Glu His Pro Phe
1 5 10 15

Cys Asn Thr Pro His Gly Gln Leu Glu Val Gln Val Pro Pro Asp Pro
20 25 30

Gly Asp Leu Val Glu Tyr Ile Met Asn Tyr Thr Gly Asn Gln Gln Ser
35 40 45

Arg Trp Gly Leu Gly Ser Pro Asn Cys His Gly Pro Asp Trp Ala Ser
50 55 60

Pro Val Cys Gln Arg His Ser Pro Asp Ala Ser Arg Leu Val Gly Ala
65 70 75 80

Thr Pro Glu Arg Pro Arg Leu Arg Leu Val Asp Ala Asp Asp Pro Leu
85 90 95

Leu Arg Thr Ala Pro Gly Pro Gly Glu Val Trp Val Thr Pro Val Ile
100 105 110

Gly Ser Gln Ala Arg Lys Ala Gly Leu His Ile Arg Ala Gly Pro Tyr
115 120 125

Gly His Ala Thr Val Glu Met Pro Glu Trp Ile His Ala His Thr Thr
130 135 140

Ser Asp Pro Trp His Pro Pro Gly Pro Leu Gly Leu Lys Phe Lys Thr
145 150 155 160

Val Arg Pro Val Ala Leu Pro Arg Thr Leu Ala Pro Pro Arg Asn Val
165 170 175

ES 2 450 998 T3

Arg Val Thr Gly Ala Tyr Gln Ala Gly Thr Pro Ala Leu Val Glu Gly
 180 185 190

Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asn Ala His Leu Thr Val Asn Gly Glu Asp
 195 200 205

Leu Gly Ala Val Pro Pro Gly Lys Phe Val Thr Ala Ala Leu Leu Asn
 210 215 220

Thr Pro Pro Pro Tyr Gln Val Ser Ala Gly Gly Glu Ser Asp Arg Ala
 225 230 235 240

Thr Ala Arg Val Ile Asp Pro Ala Ala Gln Ser Phe Thr Gly Val Val
 245 250 255

Tyr Gly Thr His Thr Thr Ala Val
 260

<210> 7

<211> 264

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Antígeno E1 de rubéola con mutaciones; varios residuos de Cys sustituidos por Ala

<400> 7

Leu Ser Val Ala Gly Val Ser Cys Asn Val Thr Thr Glu His Pro Phe
 1 5 10 15

Cys Asn Thr Pro His Gly Gln Leu Glu Val Gln Val Pro Pro Asp Pro
 20 25 30

Gly Asp Leu Val Glu Tyr Ile Met Asn Tyr Thr Gly Asn Gln Gln Ser
 35 40 45

Arg Trp Gly Leu Gly Ser Pro Asn Ala His Gly Pro Asp Trp Ala Ser
 50 55 60

Pro Val Ala Gln Arg His Ser Pro Asp Ala Ser Arg Leu Val Gly Ala
 65 70 75 80

Thr Pro Glu Arg Pro Arg Leu Arg Leu Val Asp Ala Asp Asp Pro Leu
 85 90 95

ES 2 450 998 T3

Leu Arg Thr Ala Pro Gly Pro Gly Glu Val Trp Val Thr Pro Val Ile
 100 105 110

Gly Ser Gln Ala Arg Lys Ala Gly Leu His Ile Arg Ala Gly Pro Tyr
 115 120 125

Gly His Ala Thr Val Glu Met Pro Glu Trp Ile His Ala His Thr Thr
 130 135 140

Ser Asp Pro Trp His Pro Pro Gly Pro Leu Gly Leu Lys Phe Lys Thr
 145 150 155 160

Val Arg Pro Val Ala Leu Pro Arg Thr Leu Ala Pro Pro Arg Asn Val
 165 170 175

Arg Val Thr Gly Cys Tyr Gln Cys Gly Thr Pro Ala Leu Val Glu Gly
 180 185 190

Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asn Ala His Leu Thr Val Asn Gly Glu Asp
 195 200 205

Leu Gly Ala Val Pro Pro Gly Lys Phe Val Thr Ala Ala Leu Leu Asn
 210 215 220

Thr Pro Pro Pro Tyr Gln Val Ser Ala Gly Gly Glu Ser Asp Arg Ala
 225 230 235 240

Thr Ala Arg Val Ile Asp Pro Ala Ala Gln Ser Phe Thr Gly Val Val
 245 250 255

Tyr Gly Thr His Thr Thr Ala Val
 260

<210> 8

<211> 264

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Antígeno E1 de rubéola con mutaciones; varios residuos de Cys sustituidos por Ala

10 <400> 8

Leu Ser Val Ala Gly Val Ser Cys Asn Val Thr Thr Glu His Pro Phe
 1 5 10 15

Cys Asn Thr Pro His Gly Gln Leu Glu Val Gln Val Pro Pro Asp Pro
 20 25 30

ES 2 450 998 T3

Gly Asp Leu Val Glu Tyr Ile Met Asn Tyr Thr Gly Asn Gln Gln Ser
 35 40 45

Arg Trp Gly Leu Gly Ser Pro Asn Ala His Gly Pro Asp Trp Ala Ser
 50 55 60

Pro Val Ala Gln Arg His Ser Pro Asp Ala Ser Arg Leu Val Gly Ala
 65 70 75 80

Thr Pro Glu Arg Pro Arg Leu Arg Leu Val Asp Ala Asp Asp Pro Leu
 85 90 95

Leu Arg Thr Ala Pro Gly Pro Gly Glu Val Trp Val Thr Pro Val Ile
 100 105 110

Gly Ser Gln Ala Arg Lys Ala Gly Leu His Ile Arg Ala Gly Pro Tyr
 115 120 125

Gly His Ala Thr Val Glu Met Pro Glu Trp Ile His Ala His Thr Thr
 130 135 140

Ser Asp Pro Trp His Pro Pro Gly Pro Leu Gly Leu Lys Phe Lys Thr
 145 150 155 160

Val Arg Pro Val Ala Leu Pro Arg Thr Leu Ala Pro Pro Arg Asn Val
 165 170 175

Arg Val Thr Gly Ala Tyr Gln Ala Gly Thr Pro Ala Leu Val Glu Gly
 180 185 190

Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asn Cys His Leu Thr Val Asn Gly Glu Asp
 195 200 205

Leu Gly Ala Val Pro Pro Gly Lys Phe Val Thr Ala Ala Leu Leu Asn
 210 215 220

Thr Pro Pro Pro Tyr Gln Val Ser Cys Gly Gly Glu Ser Asp Arg Ala
 225 230 235 240

Thr Ala Arg Val Ile Asp Pro Ala Ala Gln Ser Phe Thr Gly Val Val
 245 250 255

Tyr Gly Thr His Thr Thr Ala Val
 260

<210> 9

<211> 264

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Antígeno E1 de rubéola con mutaciones; varios residuos de Cys sustituidos por Ala

10 <400> 9

ES 2 450 998 T3

Leu Ser Val Ala Gly Val Ser Cys Asn Val Thr Thr Glu His Pro Phe
 1 5 10 15
 Cys Asn Thr Pro His Gly Gln Leu Glu Val Gln Val Pro Pro Asp Pro
 20 25 30
 Gly Asp Leu Val Glu Tyr Ile Met Asn Tyr Thr Gly Asn Gln Gln Ser
 35 40 45
 Arg Trp Gly Leu Gly Ser Pro Asn Ala His Gly Pro Asp Trp Ala Ser
 50 55 60
 Pro Val Ala Gln Arg His Ser Pro Asp Ala Ser Arg Leu Val Gly Ala
 65 70 75 80
 Thr Pro Glu Arg Pro Arg Leu Arg Leu Val Asp Ala Asp Asp Pro Leu
 85 90 95
 Leu Arg Thr Ala Pro Gly Pro Gly Glu Val Trp Val Thr Pro Val Ile
 100 105 110
 Gly Ser Gln Ala Arg Lys Ala Gly Leu His Ile Arg Ala Gly Pro Tyr
 115 120 125
 Gly His Ala Thr Val Glu Met Pro Glu Trp Ile His Ala His Thr Thr
 130 135 140
 Ser Asp Pro Trp His Pro Pro Gly Pro Leu Gly Leu Lys Phe Lys Thr
 145 150 155 160
 Val Arg Pro Val Ala Leu Pro Arg Thr Leu Ala Pro Pro Arg Asn Val
 165 170 175
 Arg Val Thr Gly Cys Tyr Gln Cys Gly Thr Pro Ala Leu Val Glu Gly
 180 185 190
 Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asn Cys His Leu Thr Val Asn Gly Glu Asp
 195 200 205
 Leu Gly Ala Val Pro Pro Gly Lys Phe Val Thr Ala Ala Leu Leu Asn
 210 215 220
 Thr Pro Pro Pro Tyr Gln Val Ser Cys Gly Gly Glu Ser Asp Arg Ala
 225 230 235 240
 Thr Ala Arg Val Ile Asp Pro Ala Ala Gln Ser Phe Thr Gly Val Val
 245 250 255
 Tyr Gly Thr His Thr Thr Ala Val
 260

ES 2 450 998 T3

<220>

<223> Antígeno E1 de rubéola con mutaciones; varios residuos de Cys sustituidos por Ala

<400> 10

5

Leu Ser Val Ala Gly Val Ser Cys Asn Val Thr Thr Glu His Pro Phe
1 5 10 15

Cys Asn Thr Pro His Gly Gln Leu Glu Val Gln Val Pro Pro Asp Pro
20 25 30

Gly Asp Leu Val Glu Tyr Ile Met Asn Tyr Thr Gly Asn Gln Gln Ser
35 40 45

Arg Trp Gly Leu Gly Ser Pro Asn Cys His Gly Pro Asp Trp Ala Ser
50 55 60

Pro Val Cys Gln Arg His Ser Pro Asp Ala Ser Arg Leu Val Gly Ala
65 70 75 80

Thr Pro Glu Arg Pro Arg Leu Arg Leu Val Asp Ala Asp Asp Pro Leu
85 90 95

Leu Arg Thr Ala Pro Gly Pro Gly Glu Val Trp Val Thr Pro Val Ile
100 105 110

Gly Ser Gln Ala Arg Lys Ala Gly Leu His Ile Arg Ala Gly Pro Tyr

ES 2 450 998 T3

Thr Pro Glu Arg Pro Arg Leu Arg Leu Val Asp Ala Asp Asp Pro Leu
 50 55 60

Leu Arg Thr Ala Pro Gly Pro Gly Glu Val Trp Val Thr Pro Val Ile
 65 70 75 80

Gly Ser Gln Ala Arg Lys Ala Gly Leu His Ile Arg Ala Gly Pro Tyr
 85 90 95

Gly His Ala Thr Val Glu Met Pro Glu Trp Ile His Ala His Thr Thr
 100 105 110

Ser Asp Pro Trp His Pro Pro Gly Pro Leu Gly Leu Lys Phe Lys Thr
 115 120 125

Val Arg Pro Val Ala Leu Pro Arg Thr Leu Ala Pro Pro Arg Asn Val
 130 135 140

Arg Val Thr Gly Cys Tyr Gln Cys Gly Thr Pro Ala Leu Val Glu Gly
 145 150 155 160

Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asn Cys His Leu Thr Val Asn Gly Glu Asp
 165 170 175

Leu Gly Ala Val Pro Pro Gly Lys Phe Val Thr Ala Ala Leu Leu Asn
 180 185 190

Thr Pro Pro Pro Tyr Gln Val Ser Cys Gly Gly Glu Ser Asp Arg Ala
 195 200 205

Thr Ala Arg Val Ile Asp Pro Ala Ala Gln Ser Phe Thr Gly Val Val
 210 215 220

Tyr Gly Thr His Thr Thr Ala Val
 225 230

REIVINDICACIONES

- 5 1. Antígeno E1 de rubéola que comprende los aminoácidos 201 a 432, con la condición de que dicho antígeno no presente las secuencias correspondientes a los aminoácidos 143 a 164 y 454 a 481 del antígeno E1 de rubéola nativo y que contenga dos puentes disulfuro, en el que se forma un puente disulfuro entre Cys225 y Cys235 (C13-C14) y se forma un segundo puente disulfuro entre Cys349 y Cys352 (C17-C18).
- 10 2. Antígeno E1 de rubéola según la reivindicación 1, en el que dicho antígeno se produce en forma de una proteína de fusión recombinante.
3. Antígeno E1 de rubéola según la reivindicación 1, en el que dicho antígeno se fusiona con una chaperona de la clase de las peptidil-prolil-isomerasas.
- 15 4. Molécula de ADN recombinante codificante de un antígeno E1 de rubéola que comprende una secuencia de nucleótidos codificante del antígeno E1 de rubéola según la reivindicación 1.
- 20 5. Molécula de ADN recombinante codificante de un antígeno E1 de rubéola según la reivindicación 4, en el que cadena arriba del mismo se encuentra por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de una chaperona de la clase de las peptidil-prolil-isomerasas.
- 25 6. Vector de expresión que comprende operablemente ligada una molécula de ADN recombinante según la reivindicación 4.
7. Célula huésped transformada con un vector de expresión según la reivindicación 6.
- 30 8. Método para producir una proteína de fusión soluble e inmunorreactiva de antígeno E1 de rubéola, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:
a) cultivar células huésped según la reivindicación 7,
b) la expresión de dicha proteína de fusión, c) la purificación de dicha proteína de fusión, d) el repliegamiento de dicha proteína de fusión en una conformación soluble e inmunorreactiva.
- 35 9. Método para la detección de anticuerpos específicos para rubéola en una muestra aislada, comprendiendo dicho método: a) formar una mezcla de inmunorreacción mediante la mezcla de una muestra de líquido corporal con un antígeno E1 de rubéola según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, b) mantener dicha mezcla de inmunorreacción durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los anticuerpos contra dicho antígeno E1 de rubéola presente en la muestra de líquido corporal inmunorreacione con dicho antígeno E1 de rubéola para formar un producto de inmunorreacción, y c) detectar la presencia de cualquiera de dichos productos de inmunorreacción.
- 40 10. Utilización de un antígeno E1 de rubéola según las reivindicaciones 1 a 3 en un método para la detección de anticuerpos contra rubéola en una muestra aislada.
- 45 11. Kit de reactivos para la detección de anticuerpos contra rubéola, que contiene un antígeno E1 de rubéola según las reivindicaciones 1 a 3.

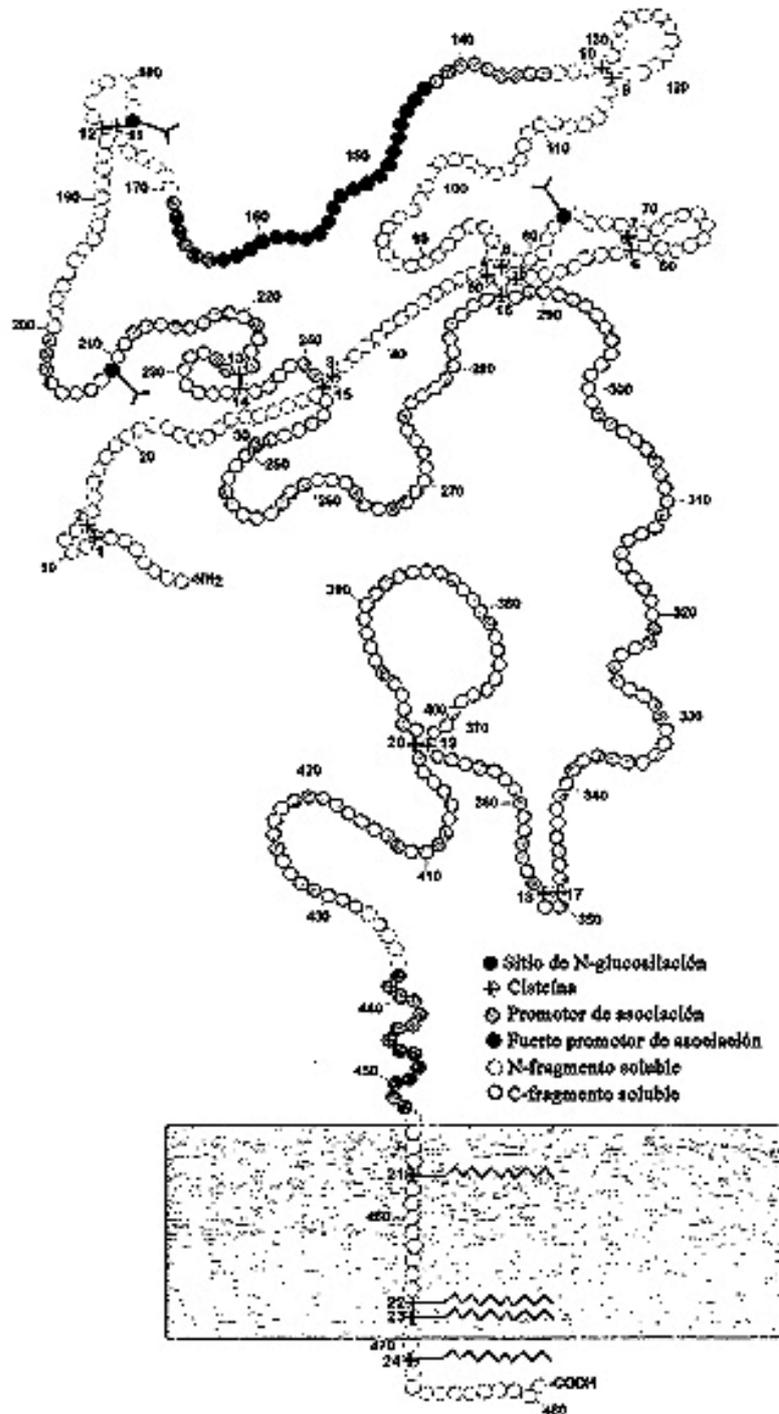


Figura 1

Tabla 3. Reactividades inmunológicas de las variantes C-terminales de E1 de rubéola (201-432) con diversas combinaciones de puentes disulfuro

	E1 (201-432) C17-C18 C19-C20	E1 (201-432) C13-C14 C17-C18 C19-C20	E1 (201-432) C13-C14 C17-C18	E1 (201-432) C17-C18	E1 (201-432) C19-C20	E1 (201-432) sin disulfuros
recuentos medios de sueros negativos para rubéola	2,830	4,610	2,072	2,076	1,453	2,487
						2,076
sueros positivos para rubéola	señal relativa	señal relativa	señal relativa	señal relativa	señal relativa	señal relativa
BRK 01/2003_106	72.1	185.6	334.1	196.0	2.5	4.2
BRK 01/2003_107	151.8	126.2	50.5	2.0	1.4	5.9
BRK 01/2003_111	12.6	13.9	17.4	5.8	2.3	1.3
BRK 01/2003_121	69.0	69.3	160.3	118.1	220.5	119.9
BRK 01/2003_129	17.8	19.4	26.3	6.6	2.2	2.5
BRK 01/2003_147	50.4	46.3	43.0	5.7	2.9	2.9
BRK 01/2003_149	18.8	26.1	46.7	14.9	1.8	2.0
BRK 01/2003_152	6.9	7.0	10.7	2.1	2.1	1.0
BRK 01/2003_153	53.8	51.5	68.4	17.9	6.3	6.3
BRK 01/2003_154	101.6	95.0	58.3	7.6	5.5	10.0
						2.8

Fig. 3

Tabla 4. Reactividades inmunológicas de variantes C-terminales de EI de rubéola (169-432 y 201-432) con diversas combinaciones de puentes disulfuro

	EI (169-432) sin disulfuros	EI (169-432) C11-C12	EI (169-432) C11-C12 C17-C18	EI (169-432) C11-C12 C19-C20	EI (169-432) C11-C12 C13-C14	EI (169-432) C11-C12 C17-C18 C19-C20	EI (201-432) C13-C14 C19-C20	EI (201-432) C17-C18 C19-C20
recuento medio de sueros negativos para rubéola	5,017	2,606	3,319	4,562	2,008	2,746	1,709	2,675
sueros positivos para rubéola	señal relativa	señal relativa	señal relativa	señal relativa	señal relativa	señal relativa	señal relativa	señal relativa
BRK 01/2003_106	1.0	1.5	1.3	5.8	309.3	96.0	325.7	71.9
BRK 01/2003_107	0.6	0.7	0.6	8.6	3.1	151.7	14.5	137.7
BRK 01/2003_111	1.2	1.6	1.5	1.7	9.4	16.8	9.8	12.7
BRK 01/2003_121	53.1	104.8	85.1	52.4	130.9	70.9	120.1	53.2
BRK 01/2003_129	0.9	1.2	1.1	2.8	11.4	25.0	13.9	17.6
BRK 01/2003_147	1.4	2.0	1.8	4.7	9.5	61.2	12.9	48.4
BRK 01/2003_149	0.7	0.9	0.9	3.3	23.0	27.5	27.0	18.1
BRK 01/2003_152	0.9	1.2	1.0	1.2	3.2	9.9	3.6	6.6
BRK 01/2003_153	2.5	4.4	3.8	7.1	28.9	70.1	34.5	50.1
BRK 01/2003_154	2.3	4.0	3.3	11.9	12.9	136.4	26.7	102.9
BRK 01/2003_119	0.8	1.1	0.9	8.3	21.9	66.9	35.8	40.7
BRK 01/2003_123	2.7	3.7	3.4	8.7	15.6	98.3	25.4	73.5
BRK 01/2003_127	1.6	3.0	2.5	4.0	19.2	43.4	21.0	34.5
BRK 01/2003_130	1.1	1.4	1.3	1.8	20.0	13.1	21.4	9.4

Fig. 4