



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101939330 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 04

(21) 申请号 200880121328. 1

(22) 申请日 2008. 12. 11

(30) 优先权数据

07024190. 6 2007. 12. 13 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 06. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2008/010532 2008. 12. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/074318 EN 2009. 06. 18

(73) 专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 C·肖尔兹 R·博尔哈根

A·恩格尔 E·法茨

P·沙尔施米特 B·厄普迈耶

T·扎恩特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 张萍 郭文洁

(51) Int. Cl.

C07K 14/19 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

EP 1780282 A1, 2007. 05. 02,

CN 1360638 A, 2002. 07. 24,

CN 1433472 A, 2003. 07. 30,

CHRISTOF GROS 等. Analyses of

Disulfides Present in the Rubella Virus E1 Glycoprotein. 《VIROLOGY》. 1997, 第 230 卷第 179-186 页.

Christian Scholz 等. Chaperone-Aided in Vitro Renaturation of an Engineered E1 Envelope Protein for Detection of Anti-Rubella Virus IgG Antibodies. 《Biochemistry》. 2008, 第 47 卷第 4276-4287 页.

Christian Scholz 等. SlyD Proteins from Different Species Exhibit High Prolyl Isomerase and Chaperone Activities. 《Biochemistry》. 2005, 第 45 卷第 20-33 页.

审查员 王金凤

权利要求书1页 说明书22页

序列表13页 附图4页

(54) 发明名称

新型风疹 E1 包膜蛋白变体及其在检测抗风疹抗体中的用途

(57) 摘要

本发明涉及可溶性风疹 E1 抗原及这些抗原的变体。这些抗原包含氨基酸 201-432 或 169-432, 并缺乏氨基酸 453-481 以及至少氨基酸 143-164。它们进一步包含跨越两个二硫键的区域。本发明还涉及编码所述风疹 E1 抗原的重组 DNA 分子, 风疹 E1 抗原作为伴侣分子融合蛋白的表达, 及其在检测样本中针对风疹的抗体的方法中的用途。

```

1  1  2  3  4  5  6  7  8  9  10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28  29  30  31  32  33  34  35  36  37  38  39  40  41  42  43  44  45  46  47  48  49  50  51  52  53  54  55  56  57  58  59  60
1  DEAFYFCIA FGGATQAFV AVRLAGVRES KIVGGCEAP WLEATGACK QLFITVWCE
61  EGARVPAAP GARLWGTOR FAEFWANAY SSGYROLAS YENFGGSYRK QYHPTAEVE
121  PAEGRSDAAG MGEPTGASVLS EPTGKQUS VAGVSNVTT
181  EHPFNTPHG QLEVQVFPDR Y  S  S
241  15  16  17  18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28  29  30  31  32  33  34  35  36  37  38  39  40  41  42  43  44  45  46  47  48  49  50  51  52  53  54  55  56  57  58  59  60
301  17  18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28  29  30  31  32  33  34  35  36  37  38  39  40  41  42  43  44  45  46  47  48  49  50  51  52  53  54  55  56  57  58  59  60
361  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28  29  30  31  32  33  34  35  36  37  38  39  40  41  42  43  44  45  46  47  48  49  50  51  52  53  54  55  56  57  58  59  60
421  SETRQ 21  22  23  24  25  26  27  28  29  30  31  32  33  34  35  36  37  38  39  40  41  42  43  44  45  46  47  48  49  50  51  52  53  54  55  56  57  58  59  60
481 R

```

1. 由 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列组成的风疹 E1 抗原,其特征是所述抗原包含两个二硫键,其中

一个二硫键在位置 25 的 Cys 和位置 35 的 Cys 之间形成,且第二个二硫键在位置 149 的 Cys 和位置 152 的 Cys 之间形成。

2. 包含权利要求 1 所述的风疹 E1 抗原的重组融合蛋白。

3. 权利要求 2 所述的重组融合蛋白,其中所述抗原与肽基-脯氨酰-异构酶类分子伴侣融合。

4. 编码风疹 E1 抗原的重组 DNA 分子,其由编码权利要求 1 所述的风疹 E1 抗原的核苷酸序列组成。

5. 编码风疹 E1 抗原的重组 DNA 分子,其由编码权利要求 1 所述的风疹 E1 抗原的核苷酸序列和其 5' 端的至少一种编码肽基-脯氨酰-异构酶类分子伴侣的核苷酸序列组成。

6. 表达载体,其包含可操作地连接权利要求 4 所述的重组 DNA 分子。

7. 宿主细胞,其以权利要求 6 所述的表达载体转化。

8. 生成可溶性和免疫反应性风疹 E1 抗原融合蛋白的方法,所述方法包括如下步骤:

a) 培养权利要求 7 所述的宿主细胞;

b) 表达所述融合蛋白;

c) 纯化所述融合蛋白;

d) 诱导所述融合蛋白重折叠为可溶性和免疫反应性构象。

9. 权利要求 1 所述的风疹 E1 抗原或权利要求 2 或 3 所述的重组融合蛋白在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测分离样本中是否存在风疹特异性抗体的方法中,所述方法包括

a) 通过将体液样本与权利要求 1 所述的风疹 E1 抗原或权利要求 2 或 3 所述的重组融合蛋白相混合,形成免疫反应性混合物;

b) 将所述免疫反应性混合物保持充分的时间,从而允许针对体液样本中存在的所述风疹 E1 抗原的抗体与所述风疹 E1 抗原或所述重组融合蛋白免疫反应,以形成免疫反应产物;以及

c) 检测任意所述免疫反应产物的存在。

10. 检测针对风疹的抗体的试剂盒,其包含权利要求 1 所述的风疹 E1 抗原或权利要求 2 或 3 所述的重组融合蛋白。

新型风疹 E1 包膜蛋白变体及其在检测抗风疹抗体中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及重组风疹 (Rubella) E1 抗原及其变体。该抗原包含氨基酸 201-432 或 169-432, 且特征在于缺失 C 末端跨膜区域和锚区段 (氨基酸 452-481) 以及至少氨基酸 143-164。该抗原进一步包含两个二硫键 (disulfide-bridges), 即, 它们包含从二硫键 Cys 225-Cys 235 至 Cys 349-Cys352 的区域或从 Cys 225-Cys 235 至 Cys 368-Cys 401 的区域或从 Cys176-Cys 186 至 Cys 225-Cys 235 的区域或从 Cys 176-Cys 185 至 Cys 349-Cys352 的区域或从 Cys 176-Cys 185 至 Cys 368-Cys 401 的区域。本发明还涉及这些二硫键抗原的生成以及它们在检测人血清中的抗风疹抗体的方法中的用途。用于检测免疫球蛋白的免疫测定的抗原试剂的开发中一个重要的目标是尽可能多地提供类天然的稳定表位。因此本发明的另一方面是包含至少两种风疹 E1 抗原的组合物, 每种抗原包含至少两个二硫键, 而在不同抗原中的二硫键组合彼此不同。

背景技术

[0002] 风疹病毒是披膜病毒科中风疹病毒属的唯一成员。小包膜 (+) RNA 病毒是一种人类病原体, 并引起温和的自身限制性儿童疾病 (德国麻疹或者风疹), 其特征不在于皮疹、淋巴结病以及低热。然而, 如果在妊娠前三个月感染, 则可能引起死产、自发性流产或多种与先天性风疹综合征相关的几种异常。先天性风疹综合征的特征性三联症包括胎儿的白内障、心脏缺陷以及耳聋。这使得风疹疫苗项目和育龄妇女的免疫状态的监督成为必要。

[0003] 风疹病毒的结构蛋白起始于单独的 110kDa 多肽前体, 其经过蛋白水解裂解得到衣壳蛋白 C 和包膜蛋白 E2 和 E1。E2 和 E1 被糖基化, 在病毒颗粒表面形成非共价异源二聚体, 其为人类免疫应答的优选靶标。具体而言, 膜锚定的 E1 蛋白胞外域是免疫显性的, 而针对 E1 的抗体在来自风疹感染个体的血清中非常丰富。

[0004] 该风疹 E1 蛋白, 也称为风疹血凝素 (参见图 1), 推测其由大胞外域 (残基 1-452), 然后是单个跨膜螺旋 (残基 453-468) 和短胞质尾区 (残基 469-481) 所组成。在跨膜区域之前的残基 438-452 也可能形成螺旋。该 E1 胞外域带有 20 个半胱氨酸残基, 其参与了十个二硫键。半胱氨酸对 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) 和 C(19)-C(20) 可被确认, 而半胱氨酸残基对 C(4)、C(5)、C(8) 和 C(16) 仍不清楚 (Gros 等人 1997, Virology 230, 179-186)。该胞外域在三个天冬酰胺 76、177 和 209 处糖基化。

[0005] 现有技术已多次尝试为诊断目的生成风疹 E1 蛋白。最初, 从感染的幼仓鼠肾或 Vero 细胞的上清液中分离将用作免疫测定的抗原的 E1 的可溶性片段。然后, 开发各种表达和分泌系统, 目的在于在真核宿主中生成可溶性和免疫反应性 E1 (Hobman 等人 .1994, Virus Res. 31, 277-289 and Seto 等人 .1994, J. Med. Virol. 44, 192-199)。糖基化和可溶性形式的全长 E1 可在杆状病毒感染的草地夜蛾 (**Seppänen** 等人 .1991, J. Clin. Microbiol. 29, 1877-1882 和 Oker-Blom 1989, Virology 172, 82-91), CHO 细胞

(Perrenoud 等人. 2004, Vaccine 23, 480-488) 以及最近在巴斯德毕赤酵母 (Wen 和 Wang 2005, Intervirology 48, 321-328) 中生成。风疹样颗粒在 BHK 细胞 (Grangeot-Keros 等人. J. lin. Microbiol. 33, 2392-2394) 和稳定转染的 CHO 细胞系 (Giessauf 等人. 2005, Arch. Virol. 150, 2077-2090) 中表达得到适于诊断目的的风疹抗原。这些风疹样颗粒是共价连接的风疹蛋白 C、E2 和 E1 的非传染性、不明确的聚集团块, 并可用于检测 M 和 G 型免疫球蛋白。

[0006] 原理上, 未糖基化形式的 E1 可在原核宿主中更有效地生成。在早期的尝试中, 全长和截短型 (207-353) 风疹 E1 被融合至来自金黄色葡萄球菌的蛋白 A, 并在大肠杆菌中生成 (Terry 等人. 1989, Arch. Virol. 104, 63-75)。这些融合蛋白具有抗原活性, 但溶解度不佳, 因此对于特异性检测抗 -E1 抗体的价值有限。总体而言, 来自原核宿主的 E1 变体显示了较强的聚集倾向, 这可能是由于它们未被糖基化, 或者由于它们被不正确地二硫键连接。在与谷胱甘肽 -S- 转移酶融合时, 只有包含小到 75 或 44 个氨基酸残基的 E1 的小型片段才能以可溶和功能形式表达 (Newcombe 等人. 1994, Clinical and Diagnostic Virology 2, 149-163 以及 Starkey 等人. 1995, J. Clin. Microbiol. 33, 270-274)。在融合至 RecA 和 β -半乳糖苷酶两者时可获得包含 82 或 171 个氨基酸残基的更大 E1 片段 (Wolinsky 等人. 1991, J. Virol. 65, 3986-3994)。

[0007] 大型富半胱氨酸蛋白如 E1 的氧化性重折叠非常困难, 因为在重折叠过程中捕获的具有错误二硫键的错误折叠中间体具有极强的聚集倾向。因此, 许多努力集中于沿 E1 多肽链发现邻接 B- 细胞表位, 并在免疫测定中使用相应的短可溶性肽作为抗原。抗体通常对小型肽抗原显示中等的亲和性, 因此一种主要的目标是理想地通过原核宿主中作为包涵体大量生成、然后通过强力复性步骤生成大量的具有高抗原性的稳定和可溶性 E1 片段。

[0008] 在 Newcombe 等人 (同上) 中, 谷胱甘肽 -S- 转移酶 (GST)E1 融合蛋白被用于在大肠杆菌中以可溶形式生成风疹 E1 抗原片段。然而, 仅在大量截短 E1 序列后才能实现无半胱氨酸区域 243-286 (44 氨基酸残基) 的可溶性表达。欧洲专利申请 EP-A-0299673 披露了保留风疹 Ig 特异性结合特征的氨基酸残基 207-353 的肽。

[0009] 此外, Starkey 等人 (同上) 披露了风疹 E1 的 44-75 氨基酸残基的极短区段在融合至 GST 时可溶。包含完整 E1 序列和大型 E1 子片段的 GST 融合蛋白表达为不溶性包涵体, 其既不能被纯化, 也不能复性, 因此被废弃。

[0010] 欧洲专利申请 EP-A-1780282 披露了可溶性风疹 E1 包膜抗原的重组表达和生成, 所述抗原特征为缺乏至少 C 末端跨膜区域和锚区段以及至少该分子中部的氨基酸 143-164 的区段。该风疹 E1 抗原包含至少跨越二硫键 Cys349-Cys 352 和 Cys 368-Cys 401 以及任选的 Cys 225-Cys 235 的区域。根据 EP-A-1782082 的教导, 有必要保持该抗原 C 末端部分的两个二硫键的完整性 (即, 封闭), 从而获得具有足够抗原性且适于在样本中检测针对风疹病毒的抗体的风疹 E1 变体。

[0011] 因此, 待解决的问题是生成可溶性风疹 E1 变体, 其能够容纳其它二硫键稳定表位的组合, 且具有较高的溶解度和免疫反应性 (即, 高抗原性), 从而非常适于作为诊断应用的抗原。

[0012] 发明综述

[0013] 本发明涉及风疹 E1 抗原及这些抗原的变体。该抗原包含氨基酸 201-432 或

169-432, 且特征在于缺失至少 C 末端跨膜区域和锚区段 (氨基酸 452-481) 以及至少该分子中部的氨基酸 143-164 的区段。它们进一步包含跨越两个二硫键, 即, 从二硫键 Cys 225-Cys 235 至 Cys 349-Cys 352 的区域或从 Cys 225-Cys 235 至 Cys 368-Cys 401 的区域或从 Cys 176-Cys 185 至 Cys 225-Cys 235 的区域或从 Cys 176-Cys 185 至 Cys 349-Cys 352 的区域或从 Cys 176-Cys 185 至 Cys 368-Cys 401 的区域。本发明还涉及包含这些风疹 E1 抗原中至少两个的组合物、这些双二硫键抗原的生成及其在检测样本中针对风疹的抗体的方法中的用途。

[0014] 优选地, 该风疹 E1 抗原进一步的特征在于它们在 C 末端缺失包含氨基酸残基 438-452 的 alpha 螺旋区域。

[0015] 本发明还涉及包含至少两种风疹 E1 抗原的组合物, 每种抗原包含氨基酸 201-432 或 169-432, 其前提是所述抗原的每一种缺乏与天然风疹 E1 抗原的氨基酸 143-164 和 454-481 对应的序列, 且其中该风疹 E1 抗原的每一种包含不同组合的两个二硫键。

[0016] 此外, 本发明涉及编码所述风疹 E1 抗原的重组 DNA 分子。优选地, 该风疹 E1 抗原被重组表达, 更优选地它作为伴侣分子融合蛋白表达。本发明还涉及包含可操作地连接或整合了上述编码风疹 E1 抗原的 DNA 的表达载体。本发明还涉及以所述表达载体转化的宿主细胞, 以及生成可溶性和免疫反应性风疹 E1 抗原 (优选包含 E1 部分和伴侣分子部分的融合蛋白, 最优选属于肽基脯氨酰异构酶类伴侣分子) 的方法。

[0017] 本发明披露了在人类样本中检测抗风疹抗体的方法, 其中风疹 E1 抗原被用作抗风疹抗体的结合伙伴。本发明进一步包含用于检测抗风疹抗体的诊断测试和试剂盒, 其包含该风疹 E1 抗原中的至少一种。

附图说明

[0018] 图 1 显示了由 Gros 等人 (1997, Virology 230, 179-186) 改编的膜锚定风疹 E1 蛋白的拓扑图。该二十四个半胱氨酸残基参照 Gros 等人连续编号。它们被描绘为带有黑色十字的白圈。成熟病毒 E1 的三个 N-糖基化位点被描绘为黑色, 并以 Y 标记。Gros 等人指定的二硫键对通过环出 (looping out) 插入序列区的相邻半胱氨酸突出显示。E1 的可溶性 N 片段以浅灰色圈标记, E1 的可溶性 C- 片段以灰色圈标记。在氨基酸 143 和 162 之间的强聚集促进区域以深灰色圈标记, 134-142 和 163-168 之间的中等聚集促进区域以灰色圈标记。推定的膜邻近螺旋区域 438-452 描绘为螺旋状排列的灰色圈。

[0019] 图 2 显示了来自风疹 Therien 菌株的 E1 包膜蛋白的氨基酸序列 (Dominguez 等人, 1990, Virology 177, 225-238)。加工该 110kDa 前体多肽后, 该成熟 E1 包含 481 个残基。推定的跨膜区段 453-468 (灰色背景, 粗体字) 将 E1 胞外域 (1-452) 锚定至病毒表面。相邻的推定螺旋区段 438-452 以斜体表示。在 E1 内的二十四个半胱氨酸以粗体 C 标记, 并根据 Gros 等人 (同上) 连续编号。E1 的可溶性 N- 和 C- 片段内的重要二硫键以方框包围。N 片段 1-133 (浅灰色) 和 C 片段 201-432 (深灰色) 与串联 SlyD* 的融合体在大肠杆菌内表达, 并由包涵体重折叠得到可溶性 E1 抗原。

[0020] 图 3 显示了对各种风疹 E1 抗原特异性检测人血清中抗风疹免疫球蛋白的能力的评估。如实施例 6 所述, 该免疫测定采用 Elecsys® 2010 分析仪实施。该相对信号可通过由七个风疹阴性样本获得的平均值标准化。该风疹阳性血清由 Bavarian Red Cross (德

国) 购得, 该风疹阴性对照由 TrinaInternational Bioreactives AG(瑞士) 购得。所有的 E1 变体为可溶性 SlyD-SlyD 融合蛋白, 它们相应的二硫键组合在括号内给出(在 E1 分子内的半胱氨酸残基的连续编号)。所有被分类为阳性的血清被确认正确。

[0021] 图 4 显示了设计用于检测人类血清中针对风疹病毒的抗体的免疫测定的其它实验结果。如实施例 6 所述, 该免疫测定采用 **Elecsys**[®] 2010 分析仪实施。该相对信号可通过由七个风疹阴性样本获得的平均值标准化。该风疹阳性血清由 Bavarian Red Cross(德国) 购得, 该风疹阴性对照由 TrinaInternational Bioreactives AG(瑞士) 购得。所有的 E1 变体为可溶性 SlyD-SlyD 融合蛋白, 它们相应的二硫键组合在括号内给出(在 E1 分子内的半胱氨酸残基的连续编号)。所有被分类为阳性的血清被确认正确。

[0022] 发明详述

[0023] 本发明涉及可溶性和免疫反应性(即, 抗原性) 风疹 E1 片段, 其包含氨基酸 169-432 的 E1 多肽区段, 并带有两个二硫键。

[0024] 根据本发明的风疹 E1 抗原包含氨基酸 201-432, 且特征在于缺失至少 C 末端跨膜区域和锚区段以及至少该分子中部的氨基酸 143-164 的区段, 即, 主张一种风疹 E1 抗原, 其条件是所述风疹 E1 抗原缺失对应于成熟或类天然折叠的风疹 E1 抗原的氨基酸 143-164 和 454-481, 并包含两个二硫键, 其中

[0025] a) 一个二硫键在 Cys 225 和 Cys 235(C13-C14) 之间形成, 且第二个二硫键在 Cys 349 和 Cys 352(C17-C18) 之间形成, 或者

[0026] b) 一个二硫键在 Cys 225 和 Cys 235(C13-C14) 之间形成, 且第二个二硫键在 Cys 368 和 Cys 401(C19-C20) 之间形成。

[0027] 此外根据本发明的风疹 E1 抗原包含 E1 氨基酸 169-432, 且特征还在于缺失至少该 C 末端跨膜区域和锚区段以及至少该分子中部的氨基酸 143-164 的区段, 即, 主张一种风疹 E1 抗原, 其条件是所述风疹 E1 抗原缺失对应于成熟或类天然折叠的风疹 E1 抗原的氨基酸 143-164 和 454-481, 并包含两个二硫键, 其中

[0028] a) 一个二硫键在 Cys 176 和 Cys 185(C11-C12) 之间形成, 且第二个二硫键在 Cys 225 和 Cys 235(C13-C14) 之间形成, 或者

[0029] b) 一个二硫键在 Cys 176 和 Cys 185(C11-C12) 之间形成, 且第二个二硫键在 Cys 349 和 Cys 352(C17-C18) 之间形成, 或者

[0030] c) 一个二硫键在 Cys 176 和 Cys 185(C11-C12) 之间形成, 且第二个二硫键在 Cys 368 和 Cys 401(C19-C20) 之间形成。

[0031] 本发明进一步的实施方式是包含氨基酸 169-432 的风疹 E1 抗原, 其特征在于缺失至少 C 末端跨膜区和锚定区段以及至少在该分子中部的氨基酸 143-164 的区段, 即, 主张一种风疹 E1 抗原, 其条件是所述风疹 E1 抗原缺失对应于天然风疹 E1 抗原的氨基酸 143-164 和 454-481 的序列, 其中二硫键在 Cys 176 和 Cys 185 之间形成。

[0032] 上文所给的二硫键的编号参考图 1 并对应于半胱氨酸残基 C11-C12(Cys 176-Cys 185)、C13-C14(Cys 225-Cys 235)、C17-C18(Cys 349-Cys 352) 和 C19-C20(Cys 368-Cys 401)。根据半胱氨酸残基的连续编号, 因此具有两个二硫键的优选风疹 E1 抗原包含二硫键组合 C13-C14 和 C17-C18, 或 C13-C14 和 C19-C20, 或 C13-C14 和 C11-C12, 或 C11-C12 和 C17-C18, 或 C11-C12 和 C19-C20。

[0033] 优选的风疹 E1 抗原包含氨基酸 201-432 的 E1 多肽片段,并带有二硫键 C13-C14 和 C17-C18,即,二硫键 Cys 225-Cys 235 和 Cys 349-Cys 352。进一步优选的风疹 E1 抗原在包含 E1 氨基酸序列 169-432 的 E1 多肽片段带有相同的二硫键组合。

[0034] 优选地,根据本发明的风疹 E1 抗原进一步的特征在于它们缺失在 C 末端推定的 α -螺旋区,其被限定为氨基酸残基 438-452(Gros 等人.,1997, Virology 230, 179-186)。

[0035] 根据本发明,风疹 E1 抗原优选包含两个二硫键的组合。这表示在一个风疹 E1 抗原内形成了不超过两个二硫键。为了确保在风疹 E1 抗原内确定的二硫键组合,不参与所需二硫键接的成熟 E1 的所有半胱氨酸被大小和结构类似于半胱氨酸的另一氨基酸所替换。优选的,这些不需要的半胱氨酸残基被丙氨酸或丝氨酸替换。其结果是,替换的氨基酸残基既不形成无效 abortive) 的二硫键,也不导致例如二硫键改组 (disulfide shuffling) 等有害的副反应。所需的匹配半胱氨酸对应该在体外重折叠过程中紧邻排列,使得它们能够容易地构建正确的二硫键,从而只要升高氧化还原电位便稳定预先形成的表位。通过形成正确的二硫键,成熟风疹 E1 抗原的类天然三维折叠(即,天然构象或结构)在局部限定的区域被基本恢复,使得抗风疹抗体能够识别并结合至根据本发明的风疹 E1 抗原变体。例如,预计在 Cys 225 和 Cys235(C13-C14) 之间形成第一二硫键并在 Cys 349 和 Cys 352(C17-C18) 之间形成第二二硫键的风疹 E1 (201-432) 抗原在位置 225、235、349 和 352 带有半胱氨酸。然而,其在位置 242(C15)、287(C16)、368(C19) 和 401(C20) 的半胱氨酸残基被改变为丙氨酸、丝氨酸或其它没有硫醇部分的氨基酸残基。该替换的氨基酸残基可根据空间和化学需求进行选择:一方面,它们应当适应风疹 E1 的局部和总体结构,另一方面,它们不应通过形成导致错误折叠、无效蛋白种类的混合二硫键干扰正确的二硫键接。

[0036] 根据本发明,术语二硫键涉及在蛋白三维结构中紧密相邻的两个半胱氨酸残基,且其硫醇部分可被氧化形成共价二硫键。二硫键形成的比率取决于两个半胱氨酸残基的接近度,定义为它们的硫原子进入硫醇/二硫化物交换所需的距离内的可能性。二硫键(disulfide bridges),也称为二硫键(disulfide bonds)(同义词分别为 SS 键和 SS 桥键),构成共价三级接触(tertiary contact),并通常起折叠构造稳定化的作用。它们通过限制未折叠多肽链的构象灵活性实现稳定,即,SS 键对蛋白稳定性的贡献在于性质的熵而非焓。二硫键形成需要氧化环境。因此,胞内蛋白由于胞内区室(例如细菌细胞质或真核胞质溶胶)主要为还原性而仅包含二硫键。然而,二硫键在分泌或易位蛋白(例如分别来自 HIV-1 和 HIV-2 的 gp41 和 gp36 的胞外域)内以及风疹包膜蛋白 E1 和 E2 内频繁出现。

[0037] 二硫键通常稳定蛋白构象,即,它们在蛋白中实现锁定类天然折叠的任务。这使得基于构象解开和氧化重折叠的顺序重折叠技术能够实施。构象重折叠表示无序、未折叠的多肽链在转移至生理缓冲条件时(=重折叠条件)形成类天然折叠的重新排列。在该类天然折叠中,匹配的半胱氨酸对通常排列为相互靠近和合适的方向,使得它们能够形成二硫键,从而稳定预先存在的类天然构象。可使该三维折叠在局部或整体意义上稳定的二硫键的形成也称为“氧化重折叠”。在本发明中,构象的解开以及氧化重折叠被用于以指定方式导入正确的二硫键。首先,在还原条件下进行各种 E1 抗原变体的体外构象重折叠。随后,通过去除相应还原剂、提高氧化还原电位进行氧化重折叠,从而诱导有利的(即,正确的)二硫键自发形成。优选地,该重折叠过程在低有效蛋白浓度为特征的条件下进行,从而避免聚

集反应。已经明确确定在重折叠过程中的低有效蛋白浓度能够提高相应目标蛋白的产率。比较完善的体外蛋白重折叠技术为所谓的基质偶联重折叠。将未折叠的蛋白分子固定至固相,该基质结合蛋白的重折叠确保了低有效浓度,因为该蛋白分子被分离(无限稀释)并无法与相邻蛋白分子相互作用。因此,可以有效抑制不想要的有害副反应如疏水重折叠中间体的聚集。

[0038] 根据本发明的风疹 E1 抗原可在其 N 或 C 末端或者两者包含一个或多个额外的氨基酸。在添加额外的氨基酸时,重要的是这些额外的氨基酸不减弱该抗原的抗原特性,即,它们不干扰该抗原在免疫测定中的用途(例如降低该抗原的总体溶解度)。必须保持抗原被样本中的抗风疹抗体识别并结合的能力。

[0039] 根据 EP-A-1780282,可以看到能够生成适合用于检测抗风疹抗体的免疫测定的重组表达的可溶性风疹 E1 包膜抗原。这些抗原的特征在于缺失至少 C 末端跨膜区和锚定区段以及至少 E1 中部的氨基酸 143-164。这些抗原包含至少跨越 C 末端二硫键 Cys 349-Cys 352 和 Cys 368-Cys 401(C17-C18 和 C19-C20) 以及额外任选的 Cys 225-Cys 235(C13-C14) 的区域,表明甚至第三二硫键可有利于获得用于免疫测定的合适抗原。

[0040] 令人惊奇的是,业已发现包含氨基酸 201-432 或氨基酸 169-432 的其它可溶性抗原性风疹 E1 变体可通过删除该跨膜区和该 C 末端锚定区段(优选氨基酸残基 453-481)后获得。根据本发明,该风疹 E1 抗原包含带有两个二硫键的可溶性片段。优选地,在该抗原中主要形成两个二硫键以稳定抗原性构象,其适于被抗 E1 免疫球蛋白识别并结合,因此适于检测抗 E1 免疫球蛋白。带有两个二硫键的 E1 区段可跨越二硫键 Cys 225-Cys 235 至 Cys349-Cys 352(C13-C14 至 C17-C18) 或二硫键 Cys 225-Cys 235 至 368-Cys 401(C13-C14 至 C19-C20) 或二硫键 Cys 176-Cys 185 至 Cys 225-Cys 235(C11-C12 至 C13-C14) 或二硫键 Cys 176-Cys 185 至 Cys 349-Cys 352(C11-C12 至 C13-C14) 或二硫键 Cys 176-Cys 185 至 Cys 368-Cys 401(C11-C12 至 C19-C20)。

[0041] 更优选地,从氨基酸 453 至约 468 的跨膜区也被删除。在该风疹 E1 中部,至少氨基酸残基 143-164 被删除。

[0042] 这些新风疹 E1 抗原已显示具有可溶性,并在不添加去污剂的生理缓冲条件(例如在环境温度下的磷酸盐缓冲系统中)下稳定。它们在血清学测定中具有高度免疫反应性(即,它们具有抗原性),并非常适于检测人血清中的抗风疹抗体。

[0043] 本发明还包括该风疹 E1 抗原的变体。本文上下文中的术语“变体”涉及与所述蛋白非常类似的蛋白。具体而言,变体可以是与最普遍蛋白同种型的氨基酸序列相比显示了氨基酸置换、缺失或插入的同种型。优选地,该种基本类似的蛋白具有与该蛋白最普遍同种型至少 80%、优选至少 85%、更优选至少 90%、最优选至少 95% 的序列相似度。术语“变体”还涉及翻译后修饰的蛋白,例如糖基化或磷酸化蛋白。变体还可以是经过修饰的蛋白或抗原,例如通过将标记或载体部分共价或非共价连接至该蛋白或抗原。可能的标记、报告基团或信号传导部分为放射性、荧光、化学发光、电发光、酶或其它部分,例如洋地黄毒苷。这些标记为本领域技术人员所知。其它标记变体为固相结合基团,例如,连接至蛋白的生物素或生物素衍生物,有关标记的具体描述披露于本说明书下文中。

[0044] “风疹 E1 抗原”为适合用于免疫测定的含有风疹 E1 氨基酸序列的蛋白。这表示该抗原能够被特异性针对风疹的抗体(例如,样本中存在的抗风疹 E1 抗体)结合或者识别并

结合。

[0045] 本发明进一步的方面涉及至少两种不同风疹 E1 抗原的组合物。术语“风疹 E1 抗原”包括含有一种以上风疹 E1 抗原的组合物。具体而言,本发明的优选实施方式为包含至少两种风疹 E1 抗原的组合物,每种抗原包含氨基酸 201-432 或 169-432,其条件是所述抗原的每一种缺乏与天然风疹 E1 抗原的氨基酸 143-164 和 454-481 对应的序列,且其中该至少两种风疹 E1 抗原的每一种包含不同组合的两个二硫键。

[0046] 至少两种不同风疹 E1 抗原的优选组合物包含具有介于 Cys 176 和 Cys185(C11-C12) 的二硫键以及介于 Cys 225 和 Cys 235(C13-C14) 的第二二硫键的抗原。该组合物中的其它抗原优选包含介于 Cys 225 和 Cys 235(C13-C14) 的二硫键以及介于 Cys 349 和 Cys 352(C17-C18) 的第二二硫键。任选地在该组合物中包含其它抗原,优选为包含介于 Cys 349 和 Cys 352(C17-C18) 的二硫键以及介于 Cys 368 和 Cys 401(C19-C20) 的二硫键的第三风疹 E1 抗原。

[0047] 在根据本发明的优选实施方式中,该风疹 E1 抗原作为重组融合蛋白生成。本发明中所用的术语“融合蛋白”指包含对应于本发明的风疹 E1 抗原的至少一种蛋白部分以及从用作融合伙伴的另一种蛋白衍生的至少一种蛋白部分。

[0048] 通常可通过将蛋白共价融合至自身强力折叠的标记或伴侣蛋白来促进蛋白的折叠和纯化。这些融合模块包括麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽 S 转移酶、硫氧还蛋白、NusA、DsbA 以及伴侣分子如 FkpA。使用这些融合模块的目的通常在于提高相应目标蛋白在过量生产的大肠杆菌宿主的胞质溶胶或周质中的可溶性表达(即,类天然折叠)。优选分子伴侣,更优选肽基脯氨酰异构酶类分子伴侣,最优选肽基脯氨酰异构酶的 FKBP 家族分子伴侣在该风疹 E1 融合多肽内用作融合蛋白。

[0049] 被称为经典“折叠助手”的分子伴侣为帮助其它蛋白的折叠并保持结构完整性的蛋白。它们具有促进蛋白在体内或体外折叠的能力。总体而言,折叠助手被细分为折叠催化剂和分子伴侣。折叠催化剂可通过其催化功能加快蛋白折叠中的速率限制步骤。已知分子伴侣结合至变性或部分变性蛋白,因此帮助蛋白复性,或者替代性地,降解蛋白。因此,与折叠催化剂不同,分子伴侣仅发挥结合功能。催化剂和分子伴侣的范例描述于 WO 03/000877。

[0050] 至今已知多种不同的分子伴侣家族。所有这些分子伴侣的特征在于它们结合未折叠或部分未折叠蛋白的能力以及连接至蛋白的正确折叠或者降解和去除变性或聚集的蛋白的生理功能。已经证实提高的分子伴侣表达可以促进蛋白的重组生成。已知可通过使用编码目标蛋白序列和分子伴侣序列两者的基因构建体实现更高的蛋白生成。在所有这些分子伴侣在生物技术中作为工具的应用中,主要的障碍在于为给定的目标分子发现合适的和功能性分子伴侣。由于许多分子伴侣显示较窄的底物特异性并以能量依赖模式起作用,对给定目标蛋白的合适(即,助溶)结合伙伴的搜索非常重要。简单而言,使用分子伴侣提高类天然折叠蛋白的产率的方法主要基于分子伴侣蛋白的结合以及因此的助溶功能。在重组生成包含分子伴侣和目标蛋白的融合蛋白后,该分子伴侣部分通常从所得的融合多肽裂解以获得纯化形式的所需蛋白。

[0051] 根据本发明,该重组生成的包含融合模块和风疹 E1 抗原的融合蛋白可容易地由可溶和功能形式的包涵体获得。此外,该披露的风疹 E1 蛋白是融合蛋白的部分,它在生理缓冲条件下显示了高溶解度,并可容易地以类天然和免疫反应性(即,抗原性)结合和构象

获得。

[0052] 根据本发明的风疹 E1 融合蛋白极易处理。换言之,这种融合蛋白可通过强力和简单的重折叠方案被容易地复性,从而以高产率得到该融合蛋白。该变性-未折叠的无结构多肽可以不同方式重折叠,所有的方式均得到具有抗原性的热动力学稳定的和可溶的类天然形式。可通过透析和通过快速稀释两者以及通过复性分子排阻色谱或基质协助重折叠实现高产率重折叠。优选地,可采用在复性(例如复性分子排阻色谱或基质协助重折叠)的过程中实现极低的有效蛋白浓度的重折叠技术。只要在重折叠过程中保持低蛋白浓度,则透析或快速稀释等重折叠技术也可取得成功。

[0053] 优选地,根据本发明的可溶性蛋白可通过将风疹 E1 抗原融合至来自肽基-脯氨酰-异构酶类的分子伴侣生成。因此,根据本发明的优选实施方式涉及将风疹 E1 抗原与肽基-脯氨酰-异构酶类分子伴侣融合,优选地与 FKBP 分子伴侣融合,最优选与 SlyD 或 FkpA 分子伴侣融合。

[0054] 除了重组生成方法外,根据本发明的风疹 E1 抗原还可通过化学合成生成,其中该合成可在本领域已知的均相溶液或固相中进行。

[0055] 上述风疹 E1 抗原可根据检测抗风疹抗体的特定免疫测定的要求进行优化。例如,该抗原可形成指定的单体或低聚体状态。低聚体形式的抗原适用于在人样本中检测 IgM 抗体的免疫测定。根据本发明的 E1 融合多肽可被聚合(例如,通过化学交联),得到被 IgM 抗体优先识别并结合的抗体。在本发明进一步优选的实施方式中,可获得由风疹蛋白 E1、E2 和核心蛋白 C 组成的混合聚合物。风疹 E2 和核心蛋白为本领域公知的免疫显性风疹抗体。

[0056] 根据本发明的风疹 E1 蛋白还可通过重组 DNA 技术的手段制备。术语“重组 DNA 分子”指通过遗传工程技术或通过化学合成对分离的多聚核苷酸区段的人工操作实现的由两种其它情况下分离的序列区段的组合制成的分子。在制备中,人们可将具有所需功能的多聚核苷酸区段连接在一起以形成所需的功能组合。

[0057] 可通过在合适的宿主细胞中复制生成大量的多聚核苷酸。编码蛋白或其片段的天然或合成的 DNA 片段可被结合进入重组多聚核苷酸构建体,通常为 DNA 构建体,其能够导入原核或低级或高级的真核细胞并进行复制,例如可参见 Sambrook 等人., (1989, Molecular Cloning :A Laboratory Manual)。

[0058] 术语低级真核细胞指例如酵母、真菌等宿主细胞。低级真核细胞通常为单细胞,但不必要。术语“原核生物”指大肠杆菌、乳酸菌、乳球菌、沙门氏菌、链状球菌、枯草芽孢杆菌或链霉菌等宿主。这些宿主也落入本发明的范围内。优选的低级真核生物为酵母,特别是裂殖酵母属、酵母菌属、克鲁维酵母菌属、毕赤酵母属(例如,巴斯德毕赤酵母)、汉森(氏)酵母属(例如,多形汉森酵母)、许旺酵母属、裂殖酵母属、耶罗威亚酵母属、接合酵母属等的物种。酿酒酵母和卡尔酵母为最常用的酵母宿主,并且也是方便的真菌宿主。术语“高级真核细胞”指由动物,例如哺乳动物、爬行动物、昆虫等衍生的宿主细胞。目前优选的高级真核宿主细胞来自中国仓鼠(例如,CHO)、猴(例如,COS 和 Vero 细胞)、幼仓鼠肾细胞(BHK)、猪肾(PK15)、兔肾 13 细胞(RK13)、人骨肉瘤细胞系 143B、人细胞系 HeLa 以及人肝癌细胞系如 Hep G2 和昆虫细胞系(例如,表皮球菌)。该宿主细胞可以悬浮液或烧瓶培养物、组织培养物、器官培养物等提供。

[0059] 本发明进一步的主题涉及编码风疹 E1 抗原的重组 DNA 分子,其包含至少一个编码

如下所述跨越包含两个二硫键的区域的风疹 E1 抗原的核苷酸序列。本发明的优选主题为编码风疹 E1 抗原的重组 DNA 分子,其包含至少一个编码风疹 E1 抗原的核苷酸序列,其上游为至少一个编码肽基-脯氨酰-异构酶类分子伴侣(优选 FKBP 分子伴侣)的核苷酸序列。根据本发明的该重组 DNA 分子编码包含氨基酸 201-432 的风疹 E1 抗原,其条件为所述抗原缺失对应于成熟风疹 E1 抗原的氨基酸 143-164 和 454-481 的序列,其中

[0060] a) 在 Cys 225 和 Cys 235 之间形成一个二硫键,且在 Cys 349 和 Cys 352 之间形成第二个二硫键,或者

[0061] b) 在 Cys 225 和 Cys 235 之间形成一个二硫键,且在 Cys 368 和 Cys 401 之间形成第二个二硫键。

[0062] 此外预期的是编码风疹 E1 抗原的重组 DNA 分子,其包含至少一个编码风疹 E1 抗原的核苷酸序列,其上游为至少一个编码肽基-脯氨酰-异构酶类分子伴侣(优选 FKBP 分子伴侣)的核苷酸序列。在该重组 DNA 分子中,该编码风疹 E1 抗原的核苷酸序列包含氨基酸 169-432,其条件是所述抗原缺失对应于成熟风疹 E1 抗原的氨基酸 143-164 和 454-481 的序列,其中

[0063] a) 在 Cys 176 和 Cys 185 之间形成一个二硫键,且在 Cys 225 和 Cys 235 之间形成第二个二硫键,或者

[0064] b) 在 Cys 176 和 Cys 185 之间形成一个二硫键,且在 Cys 349 和 Cys 352 之间形成第二个二硫键,或者

[0065] c) 在 Cys 176 和 Cys 185 之间形成一个二硫键,且在 Cys 368 和 Cys 401 之间形成第二个二硫键。

[0066] 脯氨酰异构酶可包含不同亚基或者不同功能的模块,例如,显示催化活性的模块和显示分子伴侣或结合活性的模块。FKBP 家族的该种模块元件为 FkpA、SlyD 和触发因子。在优选的实施方式中,本发明涉及重组 DNA 分子,其特征在于该编码 FKBP 分子伴侣的核酸选自 FkpA、SlyD 和触发因子。

[0067] 并非始终需要使用分子伴侣的完整序列。也可使用保留了所需结构、功能和稳定性的分子伴侣的功能性片段(所谓的模块)(参见 WO 98/13496)。

[0068] 用作本发明的表达工具的 FkpA 变体缺乏它的 N 末端信号序列。一种非常接近的 FkpA,即 SlyD,由负责催化性和分子伴侣功能的结构化的 N 末端结构域以及大量特别富集组氨酸和半胱氨酸残基的未结构化的 C 末端组成。WO 03/000878 披露了包含氨基酸 1-165 的 SlyD 的 C 末端截短变体,其对于目标蛋白的有效表达和过量生成显示了特别的积极作用。与野生型 SlyD(其在假定未结构化的环境中带有六个反应性半胱氨酸残基)不同,WO 03/000878 中披露的截短 SlyD-变体(1-165^{*})成功地避免了导致错误连接、无效和聚集倾向蛋白种类的有害二硫键改组危险。包含风疹 E1 抗原的重组 DNA 分子,其具有跨越上文所述两个二硫键的区域以及截短 SlyD(1-165^{*})代表了本发明优选实施方式。进一步优选的实施方式是串联 SlyD 分子伴侣的应用。优选地,两个串联 SlyD(1-165^{*})分子伴侣被融合至风疹 E1 的 N 末端(也可参见实施例 1)。

[0069] 在设计根据本发明的风疹 E1 抗原的优选模式中未包括可能的周质融合伙伴的信号肽。业已发现根据本发明的表达系统在作为细胞溶质表达系统时非常有利。该细胞溶质表达越有效,在不溶性和无活性包涵体内的目标融合多肽的聚集越不可避免。习惯上,表达

和过量生成策略的目标在于通过防止包涵体形成在细菌胞质溶胶中可溶性生成。根据本发明采用的方法非常不同,因为优选大量细胞溶质过量生成,然后是促进类天然折叠(即,充分结构化、类天然折叠的)的抗原性蛋白的高产率的复性方案。生成大量风疹 E1 抗原,并聚集在包涵体中,但根据本发明的重组风疹 E1 蛋白非常容易处理,例如,易于溶解并重折叠成为功能(即,抗原性)构象。

[0070] 优选地,本发明的重组 DNA 分子进一步的特征在于其包含至少一个编码 10-100 氨基酸的肽接头的核苷酸序列,该序列位于所述编码风疹 E1 抗原的序列和所述编码 FKBP 分子伴侣的序列之间。如本领域已知,该种接头多肽设计为非常适合目标应用,特别是在长度、柔性、电荷和亲水性方面。此外,编码接头的该 DNA 序列可以是表达的蛋白的蛋白水解裂解位点。该种 DNA 序列还可作为多接头,即,它可提供多重 DNA 限制性位点,以促进编码风疹 E1 抗原和分子伴侣结构域的 DNA 片段的融合。在所得融合蛋白的表达和纯化并随后重折叠为可溶性和免疫反应性构象之后,该多接头还可促进该风疹 E1 蛋白从该融合蛋白复合物的释放。

[0071] 根据本发明的可溶性风疹 E1 抗原及该蛋白的变体可从该融合构建体精确地切除,从而得到包含氨基酸 201-432 或 169-432 且特征在于缺失至少该 C 末端跨膜区和该锚定区段(氨基酸 453-481)以及至少该分子中部氨基酸 143-164 的区段的单独风疹 E1 抗原。该抗原进一步包含跨越两个二硫键的区域,即,从二硫键 Cys 225-Cys 235 至 Cys 349-Cys 352 的区域或者从二硫键 Cys 225-Cys 235 至 Cys 368-Cys 401 的区域或者从二硫键 Cys 176-Cys 185 至 Cys 225-Cys 235 的区域或者从二硫键 Cys 176-Cys 185 至 Cys 349-Cys 352 的区域或者从二硫键 Cys 176-Cys 185 至 Cys 368-Cys 401 的区域。

[0072] 本发明进一步的主题涉及重组 DNA,其包含编码 FKBP 分子伴侣的单独核苷酸序列和编码风疹 E1 蛋白的单独核苷酸序列。

[0073] 包含至少两个 FKBP 分子伴侣结构域和一个目标蛋白或目标抗原结构域的融合蛋白也非常有利。在进一步优选的实施方式中,根据本发明的该重组 DNA 分子包含两个编码 FKBP 分子伴侣的序列和一个编码风疹 E1 蛋白的序列。两个 FKBP 分子伴侣结构域的融合赋予该风疹 E1 蛋白提高的溶解性。

[0074] 术语“至少两个”用于表示两个或更多个编码 FKBP 分子伴侣结构域的核苷酸序列可用于构建重组 DNA 分子而不脱离本发明的范围。优选地,该风疹 E1 分子伴侣融合蛋白将包含至少两个和最多四个编码分子伴侣的序列。

[0075] 该 DNA 分子可设计为在该目标蛋白上游同时包含两个编码 FKBP 分子伴侣的 DNA 序列。替代性地,该两个 FKBP 结构域可排列为包夹该目标蛋白。在编码风疹 E1 抗原的序列上游包含两个 FKBP 结构域的重组 DNA 分子代表了本发明的优选实施方式。为了提高该表达系统的遗传稳定性和避免宿主细胞中的同源重组,不同的核苷酸序列可用于编码融合至该目标分子的相同分子伴侣部分。简言之,在蛋白结构(例如串联分子伴侣融合或重复接头区段等)中所有重复元件的编码序列应当不同,由此应考虑相应宿主系统所用的密码子。这可通过开发蛋白技术领域任意技术人员公知的遗传蛋白的简并容易地实现。

[0076] 在本发明替代性的实施方式中,该重组 DNA 分子的特征在于编码肽基脯氨酰异构酶分子伴侣的一个序列位于风疹 E1 抗原的上游,且编码肽基脯氨酰异构酶分子伴侣的另一序列位于编码风疹 E1 抗原的序列的下游。

[0077] 包含两个分子伴侣结构域以及编码风疹 E1 抗原的序列的该 DNA 构建体优选地还在这些结构域之间包含 10-100 氨基酸的两个接头肽。为了允许系统克隆,编码这两个接头肽序列的核苷酸序列优选是不同的。在核苷酸序列之间的差异并不一定导致该接头肽的氨基酸序列之间的差异。

[0078] 在需要从本发明的融合蛋白释放一个或所有的分子伴侣时,该接头肽被构建为带有蛋白水解裂解位点。如上所述,该蛋白水解裂解位点还可作为多接头,即,它可提供多重 DNA 限制性位点,以促进编码风疹 E1 蛋白和分子伴侣结构域的 DNA 片段的融合。本发明进一步的实施方式为编码融合蛋白的重组 DNA 分子,所述融合蛋白包含至少一个编码风疹 E1 抗原的多肽序列,该重组 DNA 分子上游为至少一个编码选自 FkpA、SlyD 和触发因子的 FKBP 分子伴侣的核苷酸序列,并额外地包含编码具有蛋白水解裂解位点的肽接头的核酸序列。

[0079] 本发明的另一方面是包含可操作地连接了根据本发明的重组 DNA 分子的表达载体,该重组 DNA 分子即编码融合蛋白的重组 DNA 分子,其包含至少一个编码风疹 E1 抗原的多聚核苷酸序列,在其上游为至少一个编码肽基脯氨酰异构酶分子伴侣(优选 FKBP 分子伴侣,其中该 FKBP 分子伴侣选自 FkpA、SlyD 和触发因子)的核苷酸序列,该表达载体被证明非常有利。

[0080] 包含根据本发明的重组 DNA 的表达载体可用于在无细胞翻译系统中表达融合蛋白或者可用于转化宿主细胞。在优选的实施方式中,本发明涉及以根据本发明的表达载体转化的宿主细胞。

[0081] 表达和克隆载体可能包含可选择的标记物,其为编码以该载体转化的宿主细胞的存活和生长所需的蛋白的基因,尽管该种标记物基因可被共同导入该宿主细胞的另一多聚核苷酸序列携带。仅表达该标记物基因的宿主细胞才能在选择性条件下存活和生长。典型的选择基因包括但不限于编码如下蛋白的基因:(a) 赋予对抗生素或其它毒性物质的耐受性(例如,氨比西林、四环素等);(b) 补充营养缺陷;或(c) 提供复合培养基不具有的关键营养素。合适的可选择标记物的选择取决于宿主细胞,针对不同宿主的合适标记物在本领域已知。

[0082] 包含目标风疹 E1 抗原的载体可通过本领域已知的任意方法导入宿主细胞。这些方法取决于细胞宿主的类型,包括但不限于,采用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖、其它物质转染,以及通过病毒感染。大量本发明的风疹 E1 蛋白可通过采用在兼容的宿主细胞中采用载体或其它表达载体表达本发明的多肽进行制备。

[0083] 根据本发明的载体的构建采用常规连接技术。分离的质粒或 DNA 片段被裂解、修改并以生成所需质粒的形式重新连接。如果需要,采用已知方式进行分析以确认构建的质粒中的正确序列。构建表达载体、制备体外转录物、将 DNA 导入宿主细胞以及实施评估表达和功能的方法为本领域技术人员已知。基因存在、扩增和/或表达可在样本中直接检测,例如,采用可基于此处提供的序列的适当标记的探针,通过常规的 Southern 印迹、Northern 印迹对 mRNA 的转录物进行定量、斑点印迹(DNA 或 RNA 分析)或原位杂交实施检测。本领域技术人员将容易地根据需要修改这些方法。

[0084] 本发明还涉及以所述表达载体转化的宿主细胞。

[0085] 此外还预期了生成可溶性和免疫反应性风疹 E1 抗原(优选包含该 E1 抗原和肽基脯氨酰异构酶类分子伴侣的融合蛋白)的方法。优选地,该肽基脯氨酰异构酶为 FKBP 分子

伴侣,更优选 FKBP 分子伴侣选自 FkpA、SlyD 和触发因子。

[0086] 该方法包括如下步骤

[0087] a) 培养以上述表达载体转化的宿主细胞,该表达载体包含编码融合蛋白的基因,该融合蛋白包含风疹 E1 抗原和肽基脯氨酰异构酶类分子伴侣或其保留了伴侣结合活性的功能性片段,

[0088] b) 表达编码所述融合蛋白的基因,

[0089] c) 纯化所述融合蛋白,

[0090] d) 重折叠为可溶性和免疫反应性(即,抗原性)构象。

[0091] 本发明披露了在分离的人类样本中检测抗风疹抗体的方法,其中该风疹 E1 抗原被用作该抗体的结合伙伴。因此,本发明涉及特异性针对分离样本中的风疹的抗体的检测方法,所述方法包括

[0092] a) 通过将体液样本与根据本发明的风疹 E1 抗原混合形成免疫反应性混合物;

[0093] b) 将所述免疫反应性混合物维持足够长的时间,从而允许该体液样本中存在的针对所述风疹 E1 抗原的抗体与所述风疹 E1 抗原免疫反应形成免疫反应产物;以及

[0094] c) 检测任意所述免疫反应产物的存在。

[0095] 本发明进一步的主题是在样本中对 IgG 或 IgM 或两者的亚类的抗风疹抗体进行检测、确定和定量的方法,其中该风疹 E1 抗原被用作该抗体的捕获剂或结合伙伴或两者。本领域技术人员已知的所有生物液体可用作检测抗风疹抗体的样本。优选的样本为体液,如全血、血清、血浆、尿液、唾液等。

[0096] 对于诊断步骤,根据本发明的可溶性风疹 E1 抗原-融合蛋白(更优选可溶性风疹 E1 抗原-分子伴侣融合蛋白)的明确优势在于,例如,风疹 E1 蛋白在生理缓冲条件下提高的溶解度和稳定性以及诊断灵敏度的伴随稳定性、更多的可及类天然构象表位的数量、容易地标记正确折叠的风疹 E1 抗原的可能性以及生产过程中的批次间的一致性。

[0097] 特定免疫球蛋白类别的特异性抗体可通过将该免疫球蛋白捕获在固定化了特异性抗原的固相上进行检测。该捕获的免疫球蛋白随后可通过特异性针对特定类别的人免疫球蛋白的标记抗体进行检测。然而,这种间接的测定形式仅可在允许在检测前去除非特异性免疫球蛋白的洗涤步骤的两部装置中进行。通常在自动化免疫测定分析仪中实现的一步测定形式需要双抗原夹心的直接测定形式,即,该特异性抗体结合至固定在固相上的第一抗原形成免疫复合物,或者介导至固相的固定化和带有标记的第二抗原,从而允许对特异性结合的抗体分析物的定量或定性检测。在一步双抗原夹心形式中,在具有相同特异性的 IgM 抗体存在下对特异性 IgG 抗体的选择性测定严格要求使用可溶性、单体或指定的低聚体抗原,如欧洲专利申请 EP 0 944 838 所述。

[0098] 公知的标记为标记物基团或效应基团,如固相结合基团。标记的可溶性风疹 E1 抗原融合蛋白,更优选地标记可溶性风疹 E1 抗原-分子伴侣蛋白代表了本发明进一步优选的实施方式。

[0099] 该标记基团可选自任意已知的信号传导部分基团,例如染料,发光标记基团,如化学发光基团,例如,吖啶酯或二噁丁烷,或者荧光染料,例如荧光素、香豆素、若丹明、噁嗪、试卤灵、花青及其衍生物。信号传导部分或标记物基团的其它范例为发光金属络合物,例如钌和铈络合物,酶,例如用于 ELISA 或 CEDIA(克隆酶供体免疫测定,例如, EP-A-0 061

888) 的酶,以及放射性同位素

[0100] 效应基团包括,例如,生物亲和性结合对的一个伙伴。在实施测定时,该效应基团特异性地并且优选非共价地与该生物亲和性结合对的另一伙伴相互作用。合适的结合对的范例为半抗原或抗原 / 抗体,生物素或生物素类似物如氨基生物素、亚胺生物素或脱硫生物素 / 亲和素或链霉亲和素、糖 / 凝集素、核酸或核酸类似物 / 互补性核酸,以及受体 / 配体如类固醇激素受体 / 类固醇激素。优选的结合对成员包括半抗原、抗原和激素。特别优选半抗原如地高辛和生物素及其类似物。

[0101] 优选地,该包含风疹 E1 抗原和脯氨酰肽基异构酶分子伴侣的可溶性复合物被用于检测抗风疹抗体(即,特异性针对风疹的抗体)的免疫测定。在进一步优选的实施方式中,包含风疹 E1 抗原和脯氨酰肽基异构酶分子伴侣的标记的可溶性复合物被用于检测风疹抗体的免疫测定。最优选地,该标记复合物为包含分子伴侣和风疹 E1 抗原的重组多肽内的分子内复合物。

[0102] 免疫测定以及实施该种测定的方法和实践应用和步骤已为本领域技术人员公知。该新型可溶性风疹 E1 抗原融合蛋白,更优选地该新型可溶性风疹 E1 抗原分子伴侣多肽可用于不依赖检测模式(例如,放射性同位素测定,酶免疫测定,电化学发光测定等)或测定原理(例如,测试条测定,夹心测定或者同源测定等)而改良检测抗风疹抗体的测定。

[0103] 为进行风疹感染的可靠和敏感性测定,有必要测量体液样本中的抗病毒抗体。根据本发明的可溶性复合物可支持在生理缓冲条件下检测抗风疹抗体,即,不需要将该抗原保持为可溶形式的去污剂。抗风疹抗体的检测是该种组合风疹检测系统的必需部分。因此,在优选的实施方式中,本发明涉及风疹检测系统,其包括基于风疹 E1 抗原融合蛋白(更优选风疹 E1 抗原分子伴侣蛋白)的使用的抗风疹抗体检测。

[0104] 如本领域所知,针对感染物(如细菌、真菌或病毒)的抗体优选通过基于双抗原夹心形式(有时该种测定形式也称为双抗原桥连形式,因为这两种抗原通过抗体分析物桥连)实施的测定进行检测。在该种测定中,要求并使用抗体以其两个(IgG, IgE)、四个(IgA)或 10 个(IgM)互补位结合至给定抗原的至少两个不同分子的能力。

[0105] 根据该桥连概念,从体液中检测抗体可在多种不同的测定装置中进行。简单的装置包括将抗原直接涂覆至固相,并使用标记形式的相同抗原来生成信号。在合适的测定条件下,样本中的特异性抗体分析物在固相结合抗原和标记抗原之间形成桥连。因此,仅在当考察的抗体存在于样本中时,才能形成桥连并检测到信号。

[0106] “固相抗原”和“检测抗原”的基础结构优选相同的结构。例如,包含一个或多个表位的蛋白(即,抗原)可被直接或间接涂覆在固相上。结合至标记或标记物的相同抗原被用作检测抗原。在双抗原桥连测定中有可能使用类似且免疫性交叉反应的不同风疹 E1 抗原。实施该种测定的必要的要求在于在两个抗原中存在相关表位。不言而喻,该种双抗原桥连测定形式存在多种变化形式。该种变化形式包括,例如,将风疹 E1 抗原间接涂覆至固相。优选地,特异性结合对,最优选地该生物素-链霉亲和素(或者-亲和素)系统被用于间接将风疹抗原固定至固相。另一方面,在此系统中用于检测的该风疹 E1 抗原可不直接带有标记物(例如,放射性同位素、酶、荧光分子等),而是可通过例如带有半抗原(例如,地高辛)被间接检测。然后,该种间接检测可通过例如标记的抗地高辛抗体实施。

[0107] 因此,本发明的一个优选实施方式为根据该双抗原桥连概念的免疫测定,其中使

用了根据本发明的第一风疹 E1 抗原和根据本发明的第二风疹 E1 抗原。

[0108] 更具体地,根据该双抗原桥连形式测定抗风疹抗体的免疫测定可通过将含有该抗风疹抗体的样本与两种不同风疹 E1 抗原(即,第一和第二风疹 E1 抗原)的孵育进行,其中每一种所述抗原特异性结合至所述抗风疹抗体。该第一抗原可被直接或间接结合至固相,且优选地带有效应基团,例如,生物素,其为生物亲和性结合对的一部分。该第二抗原带有标记或信号传导部分。从而形成免疫反应混合物。在向所述抗原添加该样本之前或者优选地在形成免疫反应混合物之后,添加可固定该第一抗原的固相。将该免疫反应混合物维持足够的时间,从而允许针对体液样本中所述风疹 E1 抗原的抗风疹抗体与所述风疹 E1 抗原免疫反应形成免疫反应产物。在后续的分步步骤中,从该固相分离液相。最后,在该固相或液相或者两者中检测任意所述免疫反应产物的存在。

[0109] 在进一步优选的实施方式中,本发明涉及根据该双抗原桥连概念的免疫测定,其特征在于第一风疹 E1 抗原融合蛋白复合物被用作捕获抗原,而第二风疹 E1 抗原融合蛋白复合物被用作检测抗原。

[0110] 本发明披露的风疹 E1 抗原融合蛋白复合物,优选地该风疹 E1 抗原分子伴侣复合物不仅提高了本来难以处理的各种蛋白(例如风疹 E1)的溶解度,还以有利方式促进了根据该双抗原桥连概念的免疫测定。

[0111] 根据该双抗原桥连概念的该种免疫测定的一个特别有吸引力的特征在于,现在能够使用不同的但是功能上相当的分子伴侣来分别与该固相结合抗原形成复合物,以及与检测抗原形成复合物。对测定的该种修改进一步减少了由于免疫交叉反应产生的非特异性结合的普遍问题。一旦不同分子伴侣被用于分别助溶该固相抗原和检测抗原,将阻碍样本中与分子伴侣反应且因而可能引起假阳性信号的抗体形成桥连。因此,在本发明的该种模式中,由于非特异性结合形成阳性信号的可能性被大大减少。因此,在优选的实施方式中,本发明涉及根据该双抗原桥连概念的免疫测定,其特征在于第一和第二分子伴侣风疹 E1 抗原复合物的第一分子伴侣和第二分子伴侣彼此不同。优选地,该第一和第二分子伴侣来源于不同 FKBP 分子伴侣。在本发明优选的实施方式中,一侧的 SlyD-E1 融合蛋白和另一侧的 FkpA-E1 融合蛋白被用于双抗原夹心免疫测定。优选的 FKBP 分子伴侣来源于大肠杆菌、梅毒密螺旋体、出血败血性巴斯德氏菌、虎列拉菌、耶尔森氏杆菌、嗜热栖热菌以及热球菌属。

[0112] 通过在双抗原夹心形式中两个融合多肽的分子伴侣部分的免疫交叉反应,可明确地引起假阳性信号,从而降低了免疫测定的特异性。两种功能相当但不同的分子伴侣作为融合伙伴在桥连形式两侧的使用可减少免疫测定中交叉反应性的常见困难。“不同的分子伴侣”可表示采用来自不同有机体的同源(即,相关的)分子伴侣以及来自相同有机体的不同分子伴侣的策略。然而,除了在双抗原夹心测定的两侧采用抗体的不同分子伴侣融合伙伴外,不作为实际抗原部分的所有部分和新表位应当表现为可溶性聚合抗干扰成分,其以足够的量被添加至该测定。抗干扰物质能,例如,包含串联 SlyD 分子,该分子包含同样作为分子伴侣-抗原多肽一部分的任意接头、间隔基和标记序列。它可甚至包含无活性形式的标记部分,即,它可包含模拟但不压制真实阳性信号的标记部分。

[0113] 这对于介导至该固相的固定化的结合部分同样适用:由于化学修饰而不再具有结合能力的该种结合部分的模拟物也可包括在抗干扰物质的设计中。该抗干扰物质可随后通过化学交联的方式进行聚合,并作为可溶性聚合物被添加至反应混合物,以捕获任意类型

的针对抗原多肽（例如，风疹免疫诊断中的风疹 E1 蛋白）的任意部分的免疫球蛋白，所述抗原多肽不作为用于抗体检测的实际病毒蛋白的部分。化学聚合抗干扰物质的高表位密度确保了 IgM 分子的有效结合和去除，该分子可与，例如，分子伴侣、接头、间隔基或标记表位反应，从而成为免疫测定中干扰的常见原因。

[0114] 多数得到了充分鉴定的分子伴侣已经从广泛用于生物技术研究的大肠杆菌中分离。由于大肠杆菌是广泛分布的细菌物种，许多哺乳动物已经形成了针对来自这种细菌的蛋白的抗体。如上所述，为了减少由该种抗体引起的假阳性反应的可能性，优选使用来自不同细菌物种的脯氨酰胺基异构酶分子伴侣对，例如来自嗜中温生物的一种分子伴侣，以及来自嗜热生物的一种分子伴侣。在进一步优选的实施方式中，该分子伴侣来自于超嗜热细菌，特别是来自于包括海栖热袍菌、风产液菌、热球菌属、热自养甲烷球菌、詹氏甲烷球菌、掘越氏热球菌、敏捷气热菌和嗜热栖热菌的细菌。

[0115] 分子伴侣-抗原复合物在一般免疫测定（优选在根据该桥连概念的免疫测定）中的使用还提供了使该种复合物的分子伴侣特异性衍生而不修饰该抗 原本身的可能性。显而易见的是，通过任意化学部分修饰蛋白，例如，将标记偶联至该分子，将带来对该多肽产生不利影响的风险。例如，被考察的表位可被改变并因而减弱，或者非特异性结合可被该种标记加强，或者可生成干扰免疫测定特异性的新表位。根据本发明，现在有可能特异性衍生风疹 E1 抗原分子伴侣复合物中的分子伴侣。

[0116] 在优选的实施方式中，根据该双抗原桥连概念的免疫测定进一步的特征在于用作捕获抗原的该第一风疹 E1 抗原分子伴侣复合物包含固相结合基团。

[0117] 在进一步的优选实施方式中，实施根据该桥连概念的免疫测定，其进一步的特征在于用作检测抗原的该第二风疹 E1 抗原分子伴侣复合物包含标记物基团或信号传导部分。

[0118] 本发明进一步涉及包含两个二硫键的至少一种风疹 E1 抗原在用于检测抗风疹抗体的诊断测试中的用途。本发明还涉及包含至少两种不同风疹 E1 抗原（每种抗体包含两个二硫键）的组合物在用于检测抗风疹抗体的诊断测试中的用途。所披露的用途和测定包括根据需 要和 本领域公知添加其它常见添加剂。

[0119] 本发明进一步的主题为用于检测针对风疹的抗体的试剂盒，其包含适于特异性结合待测定的风疹抗体并可能带有标记的至少一种风疹 E1 抗原。该试剂盒可根据需要包含其它常见添加剂。具体而言，该试剂盒包含含有氨基酸 201-432 的风疹 E1 抗原，其前提是所述抗原缺乏与天然风疹 E1 抗原的氨基酸 143-164 和 454-481 对应的序列，并包含两个二硫键，其中

[0120] a) 在 Cys 225 和 Cys235 之间形成一个二硫键，且在 Cys349 和 Cys 352 之间形成第二个二硫键，或者

[0121] b) 在 Cys 225 和 Cys235 之间形成一个二硫键，且在 Cys368 和 Cys 401 之间形成第二个二硫键，

[0122] 其中最优选抗原 a)。

[0123] 进一步优选的试剂盒包含含有氨基酸 169-432 的至少一种风疹 E1 抗原，其前提是所述抗原缺乏与天然风疹 E1 抗原的氨基酸 143-164 和 454-481 对应的序列，并包含两个二硫键，其中

[0124] a) 在 Cys176 和 Cys185 之间形成一个二硫键,且在 Cys225 和 Cys 235 之间形成第二个二硫键,或者

[0125] b) 在 Cys 176 和 Cys185 之间形成一个二硫键,且在 Cys349 和 Cys 352 之间形成第二个二硫键,或者

[0126] c) 在 Cys 176 和 Cys185 之间形成一个二硫键,且在 Cys368 和 Cys 401 之间形成第二个二硫键。

[0127] 在本发明另一个实施方式中,该试剂盒包含含有至少两种不同风疹 E1 抗原的组合物,每种抗原包含氨基酸 201-432 或 169-432,其前提是所述抗原的每一种缺乏与天然风疹 E1 抗原的氨基酸 143-164 和 454-481 对应的序列,且其中该至少两种风疹 E1 抗原的每一种包含两个二硫键。

[0128] 此外,此处披露的每一种试剂盒包含了对照和标准溶液且在一种或多种溶液中包含本领域技术人员常用的常见添加剂、缓冲剂、盐、去污剂等等的试剂。

[0129] 进一步的实施方式为根据本发明的风疹 E1 抗原作为疫苗的用途。包含作为活性成分的免疫原性多肽的疫苗的制备已为本领域所知。该种疫苗通常制备为液体溶液或悬浮液形式的注射剂。该活性成分,即,该风疹 E1 抗原或其融合蛋白与药学可接受的并与该活性成分相容的赋形剂(例如,水、水性生理缓冲液、盐水、葡聚糖、甘油、乙醇)混合。该疫苗可方便地通过注射施用。

[0130] 实施例部分阐述了本发明。

[0131] 实施例 1

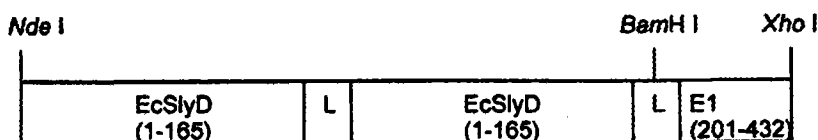
[0132] 包含串联 -EcSlyD 和风疹 E1 胞外域片段 E1(201-432) 和 (169-432) 的表达质粒的构建

[0133] 来自风疹菌株 Therien(Dominguez 等人,1990,Virology 177,225-238) 的 E1 前体蛋白的序列可从 SwissProt 数据库(acc. no. P07566) 检索。编码风疹 E1(aa 1-432) 的合成基因购自 Medigenomix(Martinsried,德国)。

[0134] 该风疹 E1 胞外域包含 20 个半胱氨酸。二硫键复杂度是在原核宿主如大肠杆菌中简单重组生成该风疹 E1 胞外域的主要障碍。在该胞外域内的 20 个半胱氨酸残基大大增加了二硫键错配的可能性,这通常会导致错误折叠和易聚集的蛋白构象。为了降低二硫键复杂度,采用了将所有半胱氨酸残基突变为丙氨酸或丝氨酸的变体。由该不含二硫键的 E1 变体开始,可获得两个大型可溶性和单体 E1 变体,分别为风疹 E1 片段 201-432 和 169-432。此后,向该 E1 片段导入二硫键对,首先单独导入,然后以两个或三个的组合导入。为此,仅通过定点突变导入二硫键形成所需的半胱氨酸,而所有其它半胱氨酸残基仍保持突变为丙氨酸。使用 QuikChange(Stratagene,La Jolla,CA,USA) 和标准 PCR 技术生成点突变、缺失和延伸变体,或者在相应表达盒内的限制性位点。基于 Novagen(Madison,WI,USA) 的 pET24a 表达载体,实施如下克隆步骤。用 NdeI 和 XhoI 消化载体,插入分别包含串联 -SlyD 和该风疹 E1 片段 201-432 或 169-432 的半合成盒。所有的重组 E1 融合多肽变体包含 C 末端六组氨酸标记,以促进 Ni-NTA- 辅助的纯化和重折叠。

[0135] 下图显示了所得的具有两个融合至其 N 末端的串联 SlyD 分子伴侣的风疹 E1 抗原 201-432 的示意图。

[0136]



[0137] 对所得质粒的插入进行测序,并发现编码所需的融合蛋白。插入的风疹 E1 抗原的氨基酸序列显示于本发明的序列表中。

[0138] 采用该策略,获得了如下在其 N 末端融合了串联 SlyD 部分的风疹 E1 抗原:

[0139] 无二硫键(作为对照 E1 变体,其缺失任意半胱氨酸残基)

[0140] SEQ ID NO. 2 中所示的 E1169-432

[0141] SEQ ID NO. 1 中所示的 E1201-432。

[0142] SEQ ID NOs. 1(201-432) 和 2(169-432) 显示了 Swiss Prot 数据库 IDP07566 获得的风疹 E1(菌株 Therien) 的氨基酸序列。

[0143] 单个二硫键:

[0144] E1 169-432(C11-C12), E1 201-432(C13-C14), E1 201-432(C17-C18), E1 201-432(C19-C20)

[0145] 双二硫键:

[0146] SEQ ID NO. 3 中所示的 E1 201-432(C17-C18, C19-C20)

[0147] SEQ ID NO. 4 中所示的 E1 201-432(C13-C14, C17-C18)

[0148] SEQ ID NO. 5 中所示的 E1 201-432(C13-C14, C19-C20)

[0149] SEQ ID NO. 6 中所示的 E1 169-432(C11-C12, C13-C14)

[0150] SEQ ID NO. 7 中所示的 E1 169-432(C11-C12, C17-C18)

[0151] SEQ ID NO. 8 中所示的 E1 169-432(C11-C12, C19-C20)

[0152] 三个二硫键:

[0153] SEQ ID NO. 11 中所示的 E1 201-432(C13-C14, C17-C18, C19-C20)

[0154] SEQ ID NO. 9 中所示的 E1 169-432(C11-C12, C17-C18, C19-C20)

[0155] 这些风疹 E1 抗原在实施例 6 和 7 所述的用于检测抗风疹抗体的免疫测定中的免疫学反应性的实验结果显示于表 1-4。注意表 3 和 4 分别显示为图 3 和 4。

[0156] 基于本实施例中所给的策略,还可获得如下构建体:

[0157] 三个二硫键

[0158] SEQ ID NO. 10 中所示的 E1 169-432(C11-C12, C13-C14, C17-C18)

[0159] 实施例 2

[0160] SS-E1(201-432 和 169-432) 融合蛋白的偶联纯化和重折叠

[0161] 所有的 E1 分子伴侣融合蛋白基本参照相同的方案进行纯化和重折叠。带有表达质粒的大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞生长于添加卡那霉素 (30 μ g/ml) 的 LB 培养基至 OD₆₀₀ 为 1,通过在 37°C 的生长温度下添加异丙基- β -D 硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1mM 诱导细胞溶质的过表达。诱导后 4 小时,离心 (20min, 5000x g) 收获细胞,冷冻并在 -20°C 下贮存。为进行细胞溶解,将冷冻的细胞团在室温下重悬浮于 100mM 磷酸钠 (pH 8.0)、7.0M GuHCl、10mM 咪唑中,搅拌所得的悬浮液两小时至细胞完全溶解。离心和过滤后,将溶解产物加至以下文所述的溶解缓冲液预先平衡的 Ni-NTA(镍-次氨基-三乙酸酯)柱上。为

为了防止过早的二硫键接和二硫键改组,在洗涤缓冲液中包含 5mM TCEP 作为还原剂,其与金属螯合柱相容。在过度洗涤步骤(> 20 柱体积的溶解缓冲液+TCEP)后,用 50mM 磷酸钠(pH 7.8)、100mM 氯化钠、5mM TCEP 替换该离液序列高的溶解缓冲液,以诱导该基质结合蛋白的构象重折叠(至少应用 10 柱体积的重折叠缓冲液,以确保没有离液序列高浓度的残留 GuHCl)。随后,通过以 50mM 磷酸钠(pH 7.8)、100mM 氯化钠洗涤诱导氧化折叠(即,半胱氨酸残基的氧化桥连)。由于二价 Ni^{2+} 离子的高有效浓度,在基质结合融合蛋白内二硫键的形成是一个极快的过程。在洗脱前,该咪唑浓度被提高至 55mM,以去除表观分子量为~50kDa 的污染蛋白。然后通过 50mM 磷酸钠(pH 7.8)、100mM 氯化钠中的 55mM-500mM 的咪唑梯度洗脱该天然融合蛋白。检测包含蛋白馏分的纯度(通过 SDS-PAGE 判断为> 95%)并汇集。最后,对蛋白采用分子排阻色谱,汇集表观二聚体馏分,浓缩并评估其光谱特性。

[0162] 实施例 3

[0163] 生物素和钆部分与 SS-E1(201-432) 的偶联

[0164] 在~10mg/ml 的蛋白浓度下分别以 N-羟基-琥珀酰亚胺活化的生物素和钆标记修饰重组风疹胞外域的赖氨酸 ϵ -氨基基团。根据相应的融合蛋白,标记/蛋白摩尔比例为 1:1 至 5:1。反应缓冲液为 150mM 磷酸钠(pH 8.0)、50mM NaCl、1mM EDTA。反应在室温下进行 15 分钟,并通过添加缓冲的 L-赖氨酸至终浓度为 10mM 停止反应。偶联反应后,使粗蛋白结合物通过凝胶过滤柱(Superdex 200HI 载量)以去除未反应的游离标记。

[0165] 实施例 4

[0166] 重组风疹 E1 融合蛋白 SS-E1(aa201-432) 在免疫诊断测试中的免疫反应性评估;在人血清中检测抗风疹 IgG 抗体

[0167] 在自动化 **Elecsys**[®] 2010 分析仪(Roche Diagnostics GmbH)中评估不同融合蛋白的免疫反应性。以双抗原夹心形式进行测量。从而,将生物素结合物(即,捕获抗原)固定在链霉亲和素涂覆的磁珠表面,而该检测抗原带有作为信号传导部分的络合钆阳离子。在 **Elecsys**[®] 2010 中的信号检测基于电化学发光。

[0168] 在特异性免疫球蛋白分析物的存在下,该显色的钆络合物被桥连至该固相,并在铂电极激发下在 620nm 下发光。信号以任意光单位输出。以 Baravrian 红十字的血清板(sera panels)的抗风疹 IgG 阳性样本进行测量。

[0169] 实施例 5

[0170] FPLC 分析(快速蛋白液相色谱分析)

[0171] 除了抗原性外,SS-E1 融合蛋白的低聚体状态、溶解度和稳定性决定了它在诊断目的中的适用性。为了优化长度,克隆 E1N- 片段(氨基酸 1-34)和 C- 片段(氨基酸 315-432)的无半胱氨酸变体,表达并纯化(作为与串联 S1yD* 的融合蛋白)。为了说明重组风疹胞外域片段的表观低聚体状态,在 Superdex 200 HR 10/30 柱上对风疹 E1 N- 片段和 C- 片段进行分析凝胶过滤。电泳缓冲液为 50mM 磷酸钾(pH 7.5)、100mM KCl。将约 200 μ l 的 SS-E1 溶液(蛋白浓度~1.0mg/ml)施加至 SEC 柱,通过 280nm 下的吸收监测洗脱。

[0172] E1N- 片段 1-55、1-104、1-133 和 1-142 以及 E1C- 片段 169-432、201-432、260-432 和 315-432 均在 Superdex 200 柱的分离范围内洗脱。所有 S1yD*-S1yD*-E1 变体在预期的约两倍分子量大小处洗脱,表现出明显的二聚体。

[0173] 实施例 6

[0174] 具有单个二硫键的风疹 E1C- 片段 201-432 在免疫诊断测试中的免疫反应性检测；在人血清中检测抗风疹 IgG 抗体

[0175] 在自动化 **Elecsys**[®] 2010 分析仪 (Roche Diagnostics GmbH) 中评估不同融合蛋白的免疫反应性。以双抗原夹心形式进行测量。将生物素结合物 (即, 捕获抗原) 固定在链霉亲和素涂覆的磁珠表面, 而该检测抗原带有作为信号传导部分的络合钆阳离子。在 **Elecsys**[®] 2010 中的信号检测基于电化学发光。在特异性免疫球蛋白分析物的存在下, 该显色的钆络合物被桥连至该固相, 并在铂电极激发下在 620nm 下发光。信号以任意光单位输出。以 Bavarian 红十字的血清板 (sera panels) 的抗风疹 IgG 阳性样本进行测量。该结果显示于表 1。

[0176] 表 1: 使用带有单个二硫键或没有二硫键的风疹 SS-E1 (aa201-432) 抗原在人血清中检测抗风疹 IgG 抗体

[0177]

	C13-C14	C17-C18	C19-C20	无二硫键
风疹阴性血清				
平均数量	2,076	1,453	2,487	2,076
风疹阳性血清	相对信号	相对信号	相对信号	相对信号
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

[0178] 如实施例 6 所述, 该免疫测定采用 **Elecsys**[®] 2010 分析仪实施。该相对信号相对于由七个风疹阴性样本获得的平均值标准化。该风疹阳性血清由 Bavarian Red Cross (德国) 购得, 该风疹阴性对照由 Trina International Bioreactives AG (瑞士) 购得。所有的 E1 变体为可溶性 S1yD* - S1yD* 融合蛋白, 它们各自的二硫键在表中指出。所有被分类为阳性的血清被确认正确。

[0179] 由表 1 可明显看到,当风疹 E1 抗原包含二硫键时该相对信号明显上升,而当该 E1 抗原缺失二硫键时该信号相对较低。在 E1201-432 片段引入单个二硫键明显提高了免疫学活性,这可能是由于对免疫球蛋白结合非常重要的构象表位稳定化所导致。同样情况发生于每一个单独二硫键 Cys 225-Cys235、Cys349-Cys352 和 Cys 368-Cys 401。然而,在二硫键 Cys 225-Cys 235 (C13-C14) 恢复时风疹 E1201-432 的免疫反应性(即,抗原性)特别提高,这可能反映了该二硫键稳定的表位在诱发抗 -E1 抗体中的核心作用(参见表 1)。

[0180] 实施例 7:

[0181] 具有多个二硫键组合的风疹 E1 C-片段 201-432 在免疫诊断测试中的免疫反应性考察;在人血清中检测抗风疹 IgG 抗体

[0182] 对三种不同风疹 E1 变体的评估,如 EP-A-1780282 所述在半胱氨酸 Cys349-Cys 352 (C17-C18) 和 Cys 368-Cys 401 (C19-C20) 之间形成两个二硫键(左列),根据本发明在半胱氨酸 Cys 225-Cys 235 (C13-C14) 和 Cys 349-Cys352 (C17-C18) 之间带有两个二硫键的变体(中间列),以及在半胱氨酸 Cys225-Cys 235 (C13-C14)、Cys 349-Cys 352 (C17-C18) 和 Cys 368-Cys 401 (C19-C20) 之间带有三个二硫键的变体(右列)。

[0183] 以样本(来自 WHO-标准)和 Baravrian 红十字的血清板(sera panels)的抗风疹 IgG 阳性样本实施测量。按照实施例 6 所述采用双抗原夹心形式在自动化 **Elecsys**[®] 2010 分析仪(Roche Diagnostics GmbH)中进行测量。结果显示于表 2。

[0184] 表 2:使用带有两个和三个二硫键组合的风疹 SS-E1(aa201-432)抗原在人血清中检测抗风疹 IgG 抗体

[0185]

C17-C18	C13-C14	C13-C14
C19-C20	C17-C18	C17-C18

[0186]

C19-C20			
风疹阴性血清平均			
数量	2,830	2,072	4,610
风疹阳性血清	相对信号	相对信号	相对信号
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

[0187] 如实施例 6 和 7 所述,该免疫测定采用 Elecsys[®] 2010 分析仪实施。该相对信号相对于由七个风疹阴性样本获得的平均值标准化。该风疹阳性血清由 Bavarian Red Cross(德国)购得,该风疹阴性对照由 Trina International Bioreactives AG(瑞士)购得。所有的 E1 变体为可溶性 SlyD^{*}-SlyD^{*}融合蛋白,它们各自的二硫键组合在表中指出。所有被分类为阳性的血清被确认正确。

[0188] 由表 2 可见,所有的 E1 变体在免疫测定中具有反应性,即,该抗原特异性结合样本中的抗风疹抗体。令人惊奇的是,当增加第二个二硫键时,该免疫活性(即,抗原性)强烈增加。这种增加是协同的而非加成的,即,单个二硫键变体的信号作用并非简单相加得到总体信号。事实上,总体的信号明显高于单个二硫键构建体生成的单个信号的总和(见表 2)。

[0189] 所有测试的变体在恢复二硫键时均出现了这种显著的信号增加。然而,不同的二硫键构建体形成了不同的信号高度。例如,具有二硫键组合 Cys 225-Cys 235 和 Cys 349-Cys352 (C13-C14 和 C17-C18) 的 E1 201-432 表现为出色的抗原,其非常适于检测人血清中的抗-E1 免疫球蛋白(见表 2)。在 10 个样本中的 9 个,根据本发明具有两个二硫键的该变体(C13-C14 和 C17-C18,中间栏)显示出比本领域现有技术已知的双二硫键变体(C17-C18 和 C19-C20)以及右栏的三桥键变体明显更高的信号。可以看到根据本发明的该风疹 E1 抗原非常适于用作检测人类样本中抗风疹抗体的免疫测定的抗原。

[0190] 对表 1 和 2 以及表 3(图 3)和 4(图 4)的进一步描述

[0191] 在表 3 和 4 中所示的结果分别证实了表 1 和 2 的结果,即,只要该风疹 E1 抗原包

含二硫键组合,该相对信号就显著上升,而当该 E1 抗原仅带有一个二硫键或完全没有半胱氨酸残基时该信号较差。

[0192] 在 E1 201-432 片段(表 3)内恢复单个二硫键可略微增加免疫活性。带有单个二硫键 Cys 225-Cys 235(C13-C14) 获得了最佳的结果。导入另一个二硫键,特别是二硫键 C17-C18 和 C19-C20 的组合以及二硫键 C13-C14 和 C17-C18 的组合导致了信号的显著上升。然而,加入第三个二硫键并没有进一步明显提高信号。

[0193] 表 4 显示了在 E1 169-432 片段内单个二硫键 Cys 176-Cys 185(C11-C12) 的恢复仅改变了免疫学活性。然而,在与其它的二硫键之一进行组合时,该 C11-C12 二硫键明显提高了信号。相应的双二硫键构建体显示了明显高于单独二硫键构建体的反应性总和的免疫反应性,这表明了协同作用模式。由组合二硫键 C11-C12 和 C13-C14 可获得最佳结果,然后是二硫键 C11-C12 与 C19-C20 和 C11-C12 与 C17-C18 的组合。风疹 E1 抗原内二硫键 C13-C14 与 C19-C20 的组合也导致了反应为较高相对信号的出色免疫学反应性。在表观惰性单独二硫键 C11-C12 被加入双二硫键组合 C17-C18/C19-C20 以获得三二硫键构建体 C11-C12/C17-C18/C19-C20 时,也可观察到信号的明显增加。可显然看到该种三二硫键 E1 构建体的免疫反应性超过了单(C11-C12) 和双二硫键构建体(C17-C18/C19-C20) 的免疫反应性的总和,再次表明了协同作用模式。

[0194] 综上所述,二硫键 Cys 176-Cys 185(C11-C12) 在单独存在时不显著增加该风疹 E1 抗原的免疫反应性(即,抗原性)。然而,只要看似惰性的单二硫键 Cys 176-Cys 185(C11-C12) 与至少一个其它的二硫键组合,该组合令人惊奇地生成具有出色免疫反应性的协同改良抗原。带有 C11-C12 二硫键与二硫键 C13-C14 或 C17-C18 或 C19-C20 中任一个的组合或者带有 C11-C12 二硫键与 C17-C18 和 C19-C20 二硫键两者的组合的 E1 变体是在人血清中检测抗风疹 E1 抗体的出色工具。

CPCH1061377P 序列表

序列表

<110> 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

<120> 新型风疹 E1 包膜蛋白变体及其在检测抗风疹抗体中的用途

<130>24647EP-IR

<160>11

<170>PatentIn version 3.2

<210>1

<211>232

<212>PRT

<213> 风疹病毒

<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
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>2

<211>264

<212>PRT

<213> 风疹病毒

<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
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												

<210>3

<211>232

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 风疹 E1 抗原 ;多个 Cys 残基被 Ala 替换

<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						
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

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 带有突变的风疹 E1 ;多个 Cys 残基被 Ala 替换

<400>4

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 HisIle 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											

 $\langle 210 \rangle_5$ $\langle 211 \rangle 232$

<212>PRT

〈213〉 人工的

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 帶有突變的風疹 E1 ; 多個 Cys 殘基被 Ala 替換

 $\langle 400 \rangle_5$

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		

<210>6

<211>264

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 带有突变的风疹 E1 ;多个 Cys 残基被 Ala 替换

<400>6

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

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
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 HisIle 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
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
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

<213> 人工的

<220>

<223> 带有突变的风疹 E1 ;多个 Cys 被 Ala 替换

<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
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

<213> 人工的

<220>

<223> 带有突变的风疹 E1 ;多个 Cys 被 Ala 替换

<400>9

```

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 TrpIle 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

<210>10

<211>264

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 带有突变的风疹 E1 ;多个 Cys 残基被 Ala 替换

<400>10

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
 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
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>11

<211>232

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223> 带有突变的风疹 E1 ;多个 Cys 残基被 Ala 替换

<400>11

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

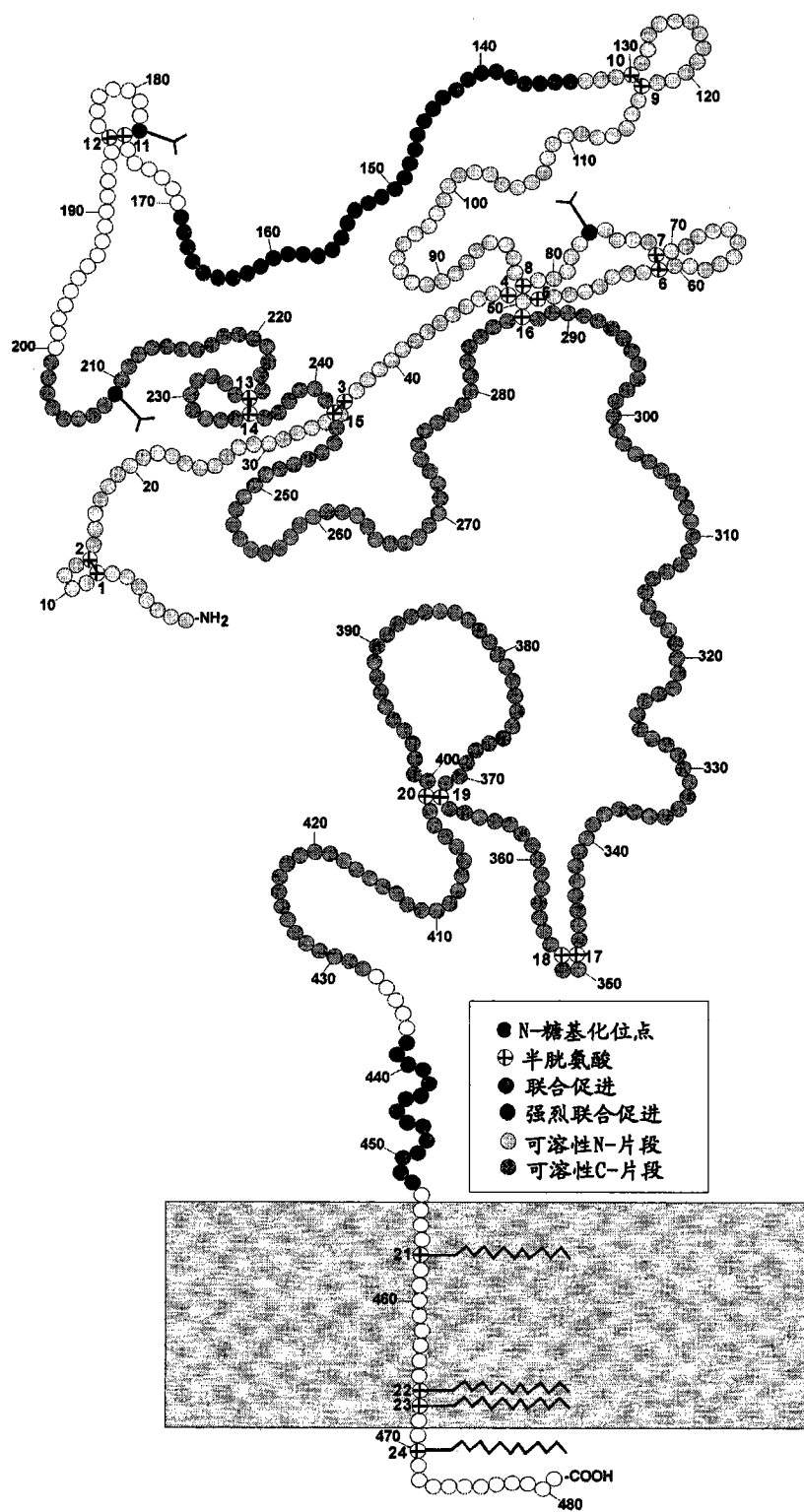


图 1

1 EEAFTYLCTA PGCATQAPVP VRLAGVRFES KIVDGGCFAP WDLEATGACI CEIPTDVSCE 60

61 GLGAWVPAAP CARIWNGTOR ACTFWAVNAY SSGGYAQLAS YFNPGGSYK QYHPTACEVE 120

121 PARGHSDAAC WGFPTDIVMS VF TRTVWQLS VAGVSCNVTT 180

181 EHPFCNTPHG QLEVQVPPDP Y 13 14 240

241 15 16 300

301 17 18 360

361 19 20 420

421 SETRQTWA EWAAAHNNOL TLGAICALPL AGLIACCAKC LYYLRGAIAP 480

481 R

图 2

表3. 具有不同二硫键组合的C-末端风疹E1 (201-432) 变体的免疫反应性

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)
C13-C14

E1 (201-432)
C17-C18

E1 (201-432)
C19-C20

E1 (201-432)
无二硫键

风疹阴性血清 平均数量	2,830	4,610	2,072	2,076	1,453	2,487	2,076
----------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

风疹阳性血清	相对信号	相对信号	相对信号	相对信号	相对信号	相对信号	相对信号
BRK 01/2003_106	72.1	185.6	334.1	196.0	2.5	4.2	1.2
BRK 01/2003_107	151.8	126.2	50.5	2.0	1.4	5.9	0.7
BRK 01/2003_111	12.6	13.9	17.4	5.8	2.3	1.3	1.1
BRK 01/2003_121	69.0	69.3	160.3	118.1	220.5	119.9	93.8
BRK 01/2003_129	17.8	19.4	26.3	6.6	2.2	2.5	1.2
BRK 01/2003_147	50.4	46.3	43.0	5.7	2.9	2.9	1.5
BRK 01/2003_149	18.8	26.1	46.7	14.9	1.8	2.0	0.9
BRK 01/2003_152	6.9	7.0	10.7	2.1	2.1	1.0	1.0
BRK 01/2003_153	53.8	51.5	68.4	17.9	6.3	6.3	3.2
BRK 01/2003_154	101.6	95.0	58.3	7.6	5.5	10.0	2.8

图 3

表4. 具有不同二硫键组合的C-末端风疹E1 (169-432和201-432) 变体的免疫反应性

风疹阴性血清 平均数量	E1 (169-432) 无二硫键	E1 (169-432) C11-C12	E1 (169-432) C11-C12 C17-C18	E1 (169-432) C11-C12 C19-C20	E1 (169-432) C11-C12 C13-C14	E1 (169-432) C11-C12 C17-C18 C19-C20	E1 (201-432) C13-C14 C19-C20	E1 (201-432) C17-C18 C19-C20	
	5,017	2,606	3,319	4,562	2,008	2,746	1,709	2,675	
	相对信号	相对信号	相对信号	相对信号	相对信号	相对信号	相对信号	相对信号	
	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	

图 4