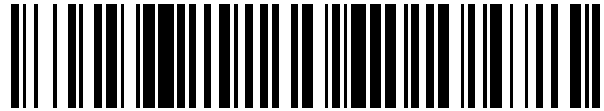


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 569**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2008 E 08716361 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2035833**

54 Título: **Biochip y procedimiento para la comprobación selectiva de infecciones por Chlamydia trachomatis**

30 Prioridad:

**07.03.2007 EP 07004665**

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

**27.11.2013**

73 Titular/es:

**MIKROGEN GMBH (100.0%)  
Floriansbogen 2-4  
82061 Neuried, DE**

72 Inventor/es:

**SIMNACHER, ULRIKE;  
FORSBACH-BIRK, VERA;  
ESSIG, ANDREAS y  
PFREPPER, KLAUS-INGMAR**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 431 569 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

Biochip y procedimiento para la comprobación selectiva de infecciones por *Chlamydia trachomatis*

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la comprobación selectiva de infecciones por *Chlamydia trachomatis*, en el que se usan los antígenos CT017, CT098, CT318-L1P, CT431, CT456-TARP, CT603-TSAP y CT664 para la comprobación de anticuerpos específicos de *Chlamydia trachomatis* en muestras de mamíferos. Además, la invención se refiere a un biochip que presenta los antígenos que se han mencionado anteriormente para la comprobación de los anticuerpos específicos de *Chlamydia trachomatis*. Además, la presente invención se refiere a un kit de ensayo que es adecuado para la comprobación de infecciones por *Chlamydia trachomatis*.

15 Las clamidias son agentes infecciosos extendidos a nivel mundial de considerable relevancia clínica y epidemiológica. Se trata de bacterias de replicación intracelular obligada que existen, morfológica y funcionalmente, en dos formas celulares diferentes (cuerpos elementales altamente infecciosos metabólicamente inactivos y cuerpos reticulares intracelulares con capacidad de replicación) y que recorren un ciclo de vida típico. Las células diana de los patógenos, por norma general, son las células epiteliales de la conjuntiva así como las mucosas del aparato respiratorio y del aparato genital.

20 El reservorio de patógenos para *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia pneumoniae* (nueva nomenclatura también: *Chlamydophila pneumoniae*) es el ser humano, mientras que para *Chlamydia psittaci* (nueva nomenclatura también: *Chlamydophila psittaci*) pueden ser fuentes importantes de infección, sobre todo, las aves, sin embargo, también animales de producción. Debido a su ubicación intracelular, las clamidias han desarrollado estrategias para evitar la defensa inmunitaria del hospedador, de tal manera que no es infrecuente una cronicación de la infección con el riesgo de afecciones secundarias. En tales casos, el diagnóstico mediante la comprobación del patógeno la mayoría de las veces ya no es posible, mientras que la comprobación de anticuerpos específicos de especie adquiere una considerable importancia para el diagnóstico.

30 Las clamidias se pueden multiplicar también en células de defensa inmunitaria del hospedador, tales como monocitos y linfocitos. Posiblemente, por ello, los patógenos consiguen diseminarse desde el lugar de la primoinfección y llegar, de este modo, a otros compartimentos (articulaciones, vasos). La primoinfección con frecuencia evoluciona clínicamente de forma no característica y de manera oligosintomática, por lo que se favorece la propagación y la diseminación de la infección. Ya que, al parecer, una primoinfección no induce ninguna inmunidad completa, precisamente en *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia trachomatis* no son infrecuentes las reinfecciones. De forma correspondiente, la terapia con frecuencia es de larga duración y se consigue solamente con antibióticos que alcanzan, dentro de la célula, elevados niveles de principio activo. Precisamente debido a su sintomatología clínica no característica, para la comprobación de infecciones por clamidias el diagnóstico de laboratorio desempeña un papel decisivo.

40 *Chlamydia trachomatis* pertenece, en los países industrializados, a las causas más frecuentes de enfermedades de transmisión sexual (ETS). Según estimaciones del "Center of Disease Control and Prevention" de Estados Unidos, más de 700 millones de seres humanos están infectados por *Chlamydia trachomatis*. La incidencia anual se sitúa en 50 millones. A nivel de Alemania se cuenta con una incidencia anual de 300.000 (en total aproximadamente 1,15 millones). En los países en vías de desarrollo, el patógeno causa, con el tracoma, una queratoconjuntivitis crónica que, al igual que antes, en estos países es la causa más frecuente de la ceguera evitable.

45 El espectro de enfermedades de *Chlamydia trachomatis* depende del serotipo del patógeno. Los serotipos A-C causan el tracoma, los serotipos L1-L3 causan el linfogranuloma venéreo, una enfermedad de transmisión sexual que cursa de forma invasiva en estadios con aparición, sobre todo, en zonas tropicales. Por el contrario, los serotipos D-K desempeñan en los países industrializados el papel decisivo como causa de infecciones urogenitales que pueden conducir a esterilidad debida a infección y artritis postinfecciosa. La transmisión perinatal del patógeno de la madre infectada al recién nacido conduce a la denominada conjuntivitis del recién nacido o también a la neumonía del recién nacido. Debido a las graves afecciones secundarias que pueden causar las infecciones por *Chlamydia trachomatis* no reconocidas y, por tanto, no tratadas, en los países escandinavos y angloamericanos se ofrecen pruebas de despistaje para grupos de riesgo. Actualmente todavía no está claro si se introducirán en Alemania también pruebas de despistaje.

60 *Chlamydia pneumoniae* es un patógeno conocido desde hace tan solo aproximadamente 15 años que puede causar, normalmente, infecciones del aparato respiratorio, tales como sinusitis, faringitis, bronquitis y neumonía. Los estudios seroepidemiológicos indican que *Chlamydia pneumoniae* está muy extendida con prevalencias de anticuerpos de más del 50 %.

65 Sin embargo, finalmente la relevancia clínica de *Chlamydia pneumoniae* no se ha aclarado de forma definitiva. En el marco de la red de competencia del BMBF (Ministerio de Educación e Investigación) "neumonía extrahospitalaria" (CAPNETZ), actualmente se intenta aclarar la importancia del patógeno en la neumonía extrahospitalaria, lo que resulta, sin embargo, extremadamente difícil debido a dificultades metodológicas en el diagnóstico de laboratorio, particularmente en la serología. Sin embargo, es aún más difícil estimar la relevancia del patógeno en enfermedades

extrapulmonares. Es de importancia clave y también en cuanto a la política sanitaria y la economía nacional la cuestión de si *Chlamydia pneumoniae* interviene en la aterogénesis y, por tanto, también es corresponsable de las enfermedades sociales infarto cardiaco e ictus.

- 5 *Chlamydia psittaci* es el patógeno de la ornitosis o también de la psitacosis. A este respecto se trata de una zoonosis que se transmite al ser humano, por norma general, por aves decorativas o de producción infectadas mediante secreción y excreción de secreciones y excrementos que contienen patógeno, por vía aérea o, más infrecuentemente, a través del contacto directo. Por tanto, están en riesgo de infección, además de los dueños de aves decorativas y de producción, sobre todo los pajareros y los empleados en la industria procesadora de aves.
- 10 Globalmente, la enfermedad en Alemania se ha hecho poco frecuente, no obstante, debido al difícil diagnóstico se ha de partir de una cifra desconocida relativamente alta.

La principal forma de manifestación de la infección es una neumonía atípica que puede ir acompañada de una sintomatología sistémica grave. No tratada, la infección puede tener un curso letal. Hasta ahora no se ha observado 15 una transmisión de persona a persona, sin embargo, el patógeno se considera altamente contagioso y se clasifica, según el reglamento de sustancias biológicas, en el nivel 3 de seguridad de laboratorio.

Además de esto, *Chlamydia psittaci* tiene una gran importancia económica en el ámbito de la tenencia de animales de producción, donde pueden aparecer infecciones graves de evolución sistémica y que tienen en cabañas infectadas, particularmente en ovejas, sin embargo, también otros animales de producción, elevados índices de abortos.

20

El diagnóstico de infecciones por clamidias generalmente es difícil, complejo y caro. Para la comprobación de infecciones crónicas por *Chlamydia trachomatis* hasta ahora no están disponibles procedimientos de comprobación 25 suficientemente sensibles, normalizados y fáciles de evaluar que, además, no generen resultados de falsos positivos.

La comprobación de una infección por *Chlamydia trachomatis* hasta ahora se ha llevado a cabo, por ejemplo, con ensayos de amplificación de ácido nucleico (NAAT, nucleic acid amplification test). Estos procedimientos se llevaron 30 a cabo para la comprobación de infecciones genitales de forma rutinaria en laboratorios clínicos. Sin embargo, tales ensayos disponibles en el mercado son bastante caros y demasiado complejos para utilizarlos a gran escala. Precisamente debido a la elevada selectividad de este procedimiento de ensayo existe el riesgo de contaminaciones cruzadas o de resultados de ensayo erróneos debido a una incorrecta manipulación de las muestras. Por tanto, este procedimiento de ensayo requiere una gran atención con respecto al control de calidad y la formación del personal de laboratorio.

35

Además, existe el riesgo de que se modifique el patógeno o su secuencia de ácido nucleico y ya no sea posible una comprobación con las sondas anteriores. Además, existe el riesgo de que se generen resultados de falsos positivos cuando más de una especie de clamidia presenta la secuencia de ácido nucleico de la sonda.

40

Otro procedimiento conocido se basa en la comprobación de anticuerpos séricos contra *Chlamydia trachomatis*. Las comprobaciones de anticuerpos específicos de género disponibles hasta ahora en el mercado registran anticuerpos contra todas las especies de clamidias y, con frecuencia, son muy difíciles de interpretar en vista de la elevada prevalencia de pacientes positivos para anticuerpos contra *Chlamydia pneumoniae*. Los ensayos específicos de especie técnicamente son muy complejos y son difíciles de valorar (ensayo de inmunofluorescencia).

45

En el pasado ya ha habido muchos intentos infructuosos de identificar antígenos de clamidias inmunodominantes y específicos. En particular, ha resultado difícil el diagnóstico específico de especie mediante antígenos de *Chlamydia pneumoniae*. En este caso se dieron discrepancias en la reactividad entre el método de referencia válido hasta ahora MIF (ensayo de inmunofluorescencia) y los antígenos recombinantes (Maile et al., 2005, "recomLine Chlamydia: a new serological test system for the detection of antibodies against *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci*", 3. Deutscher Chlamydienworkshop, 09.03.-11.03.2005, Jena).

50

El documento WO 2004/074318 describe polipéptidos de *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* y *Chlamydia pneumoniae* y su uso en el diagnóstico. Entre más de 10 polipéptidos distintos que se han de utilizar para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* se mencionan, entre otros, también la proteína CT664.

55

Sharma et al., Infection and Immunity (marzo 2006), pág. 1490-1499 describen la expresión de 156 proteínas de fusión de *Chlamydia trachomatis* que se utilizaron en placas de microtitulación para el diagnóstico de infecciones urogenitales por *C. trachomatis*. En esta publicación, ciertamente se menciona la proteína CT431 en una lista de 156 proteínas, sin embargo, este antígeno no presentaba ninguna reactividad significativa con los sueros ensayados. Este pasaje de la bibliografía prefiere el uso de otros antígenos para el diagnóstico.

60

Sánchez-Campillo, Electrophoresis (1999), pág. 2269- 2279 describe la identificación de proteínas inmunorreactivas de *Chlamydia trachomatis* mediante Análisis de Transferencia de Western y electroforesis en gel bidimensional con sueros de pacientes. Para el diagnóstico de rutina, el método descrito allí no es adecuado, debido a que es

65

demasiado complejo y demasiado caro.

Biendo et al., Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology (noviembre 1996), pág. 706-709 describen los límites del ensayo de microinmunofluorescencia y las ventajas de la inmunotransferencia en el diagnóstico de infecciones por clamidias.

El documento WO 2007/110700 no publicado previamente desvela composiciones inmunógenas que se han de usar, sobre todo, como vacunas. En esta publicación se mencionan antígenos con los números 456 y 017.

Los ensayos iniciales en el ámbito de la presente invención para la clonación y la producción recombinante de proteínas de clamidias conocidas, tales como, por ejemplo, las proteínas PGP3 (Maile et al., 2004, "Evaluation of selected recombinant chlamydial antigens for serological diagnosis of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* infection", 5th Meeting of the European Society for Chlamydia Research, 01-04.09.2004, Budapest), MOMP, OMP2, hsp60, MIP y MOMPIV de *Chlamydia trachomatis* no eran adecuados para el desarrollo de un procedimiento específico de comprobación para infecciones por *Chlamydia trachomatis*.

Esto muestra que con antígenos de lisado de células completas basados en cuerpos elementales de clamidias purificados no se pueden conseguir avances sustanciales en el diagnóstico serológico de clamidias. De este modo, hasta ahora tampoco se conocen antígenos específicos de *Chlamydia pneumoniae* que permitan una diferenciación serológica segura de *Chlamydia pneumoniae* y de infecciones por *Chlamydia trachomatis*.

Además se desarrolló una gran cantidad de procedimientos basados en PCR, desarrollándose, por ejemplo, diferentes genes diana de *Chlamydia pneumoniae* a partir de muestras respiratorias y no respiratorias. Sin embargo, muchos de estos procedimientos de PCR no eran lo suficientemente fiables o estables para posibilitar resultados reproducibles en exámenes clínicos rutinarios. Por ello, estos ensayos se usaron más bien como herramientas de investigación.

Además se usaron procedimientos basados en ensayos inmunoenzimáticos para la detección de infecciones por *Chlamydia trachomatis* mediante anticuerpos monoclonales o policlonales. Sin embargo, estos ensayos hasta ahora no han resultado exitosos, particularmente a causa de su reducida sensibilidad y de los resultados de ensayo de falsos positivos generados por los mismos.

Por tanto, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento de comprobación selectivo para infecciones por *Chlamydia trachomatis*. Este procedimiento no debe presentar reactividad cruzada con respecto a otros patógenos y posibilitar, por ello, en particular una delimitación con respecto a infecciones por *Chlamydia pneumoniae*.

Otro objetivo de la presente invención consiste en averiguar, en el diagnóstico, de qué tipo de infección por clamidias se trata. A este respecto se considera una infección aguda por *Chlamydia pneumoniae* o una infección crónica por *Chlamydia trachomatis* así como una infección aguda por *C. trachomatis*. Otro objetivo de la presente invención consiste en facilitar antígenos altamente específicos y/o altamente sensibles para el diagnóstico diferencial de infecciones por clamidias.

En particular, el procedimiento de ensayo debe presentar una alta sensibilidad para posibilitar la comprobación de infecciones crónicas por *Chlamydia trachomatis*. Además, el procedimiento de ensayo debe ser adecuado para la comprobación selectiva de infecciones por *Chlamydia trachomatis* para exámenes rutinarios de laboratorio debido a un manejo más económico, sencillo y seguro y, adicionalmente, ser adecuado no solamente para la comprobación del patógeno de la enfermedad, sino también para la valoración de la progresión de la enfermedad o del estadio de la enfermedad.

El procedimiento de ensayo selectivo debe ser adecuado, en particular, para la aplicación en ensayos multiparamétricos basados en la tecnología de biochip o Luminex, en particular debido a que las infecciones por clamidias también pueden ser el desencadenante de cuadros clínicos con complicaciones secundarias típicas, tales como la artritis reactiva. Precisamente el diagnóstico de la artritis está asociado actualmente, debido a la necesidad de encontrar la causa exacta entre muchos potenciales patógenos, a una complejidad de costes extremadamente altos de ensayos individuales.

Un objetivo también es proporcionar un procedimiento de ensayo para el ámbito veterinario, ya que también en este caso existe una gran necesidad de ensayos selectivos.

El objetivo de acuerdo con la invención se consiguió mediante el uso de antígenos recombinantes inmovilizados individualmente en lugar de lisados y cuerpos elementales usados convencionalmente y representa una considerable mejora en el ámbito del diagnóstico serológico de clamidias. La identificación de los antígenos específicos de *Chlamydia trachomatis* está representada en los ejemplos.

La caracterización exitosa de proteínas de clamidias inmunodominantes y específicas de especie, que se pueden utilizar como antígenos para el diagnóstico, se pudo conseguir, inesperadamente, mediante expresión exclusiva *in vivo*, identificándose antígenos que escapan a los enfoques de diagnóstico convencionales. En este caso se identificaron todos los antígenos mediante inmunoelectroforesis 2D y transferencias de Western con ayuda de sueros caracterizados de pacientes así como análisis consecutivo mediante espectrometría de masas de puntos reactivos. Esto también está descrito en los ejemplos.

La serorreactividad ventajosamente alta de los antígenos de acuerdo con la invención se consiguió clonándose los antígenos candidatos en vectores de expresión bacterianos y expresándose de forma recombinante y analizándose, después de una eventual optimización de la expresión y purificación de proteínas, en Ensayos de Línea para hallar una combinación óptima de antígenos recombinantes. En los "Ensayos de Línea" se aplican varios antígenos producidos, la mayoría de las veces, de forma recombinante como bandas estrechas sobre un soporte adecuado (por ejemplo, nitrocelulosa) y las tiras de ensayo se hacen reaccionar con el líquido de examen (por ejemplo, suero). Estos antígenos posibilitan de forma ventajosa, por un lado, una diferenciación precisa de especies y, por otro lado, una diferenciación entre infecciones por clamidias activas y finalizadas. Esto, hasta ahora, solo era posible mediante procedimientos de PCR.

La serología específica de especie dependiente del estadio para el diagnóstico de infecciones por *Chlamydia trachomatis* tiene un papel importante en las decisiones terapéuticas, sin embargo, también en la valoración del pronóstico de los estados patológicos existentes.

Como ya se ha mencionado, el uso de los antígenos de acuerdo con la invención en un procedimiento multiparamétrico posibilita, de forma ventajosa, la comprobación simultánea de distintos patógenos, en particular la comprobación de los distintos patógenos de clamidia, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia psittaci*. Una ventaja del uso de más de un antígeno en el procedimiento de comprobación consiste en que aumenta la seguridad del ensayo. Los antígenos de acuerdo con la invención, por un lado, poseen una mayor especificidad en infecciones clínicamente relevantes por *Chlamydia trachomatis*, así como, por otro lado, una menor reactividad cruzada con *Chlamydia pneumoniae* que los antígenos producidos de forma recombinante conocidos hasta ahora (véase la Tabla 3). Los antígenos de acuerdo con la invención hasta ahora no eran conocidos en relación con la comprobación selectiva de *Chlamydia trachomatis*.

El antígeno CT456-TARP ciertamente ya se ha descrito (Clifton et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2004, jul 6; 101 (27): 10166-71; Clifton et al., Infect Immun. 2005, jul; 73 (7): 3860-8; Jewett et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 oct 17; 103 (42): 15599-604.), sin embargo, no en relación con la comprobación de *Chlamydia trachomatis*. En el ámbito de la presente invención se comprobó que, en este caso, se trata de un antígeno altamente específico y altamente sensible que es particularmente adecuado para el diagnóstico diferencial de infecciones por clamidias.

Ya se han descrito algunos otros antígenos inmunorreactivos de *Chlamydia trachomatis*: CT858-CPAF (Sharma et al., Infect Immun. 72 (12): 7164- 71); CT089 y CT795 (Sharma et al., Infect Immun. 74 (3): 1490- 99) y CT813 (Chen et al., Infect Immun. 74 (8): 4826- 40). Estas cuatro proteínas se examinaron con fines comparativos en el ámbito de la presente solicitud (Tabla 3). Los resultados muestran que los cuatro antígenos conocidos CT858-CPAF, CT089, CT795 y CT813 en infecciones por *Chlamydia pneumoniae* así como en donantes sanos de sangre reaccionan con anticuerpos contra *Chlamydia trachomatis* más frecuentemente que los antígenos de acuerdo con la invención (véase la Tabla 3).

La presente invención, por tanto, se refiere a un procedimiento para la comprobación selectiva de infecciones por *Chlamydia trachomatis*, seleccionándose los antígenos del grupo compuesto por: CT017, CT098, CT318-L1P, CT431, CT456-TARP, CT603-TSAP y CT664 así como adicionalmente de forma preferente también de fragmentos y subsecuencias de los anteriores antígenos o de antígenos esencialmente iguales a esto que se usan para detectar anticuerpos en muestras. Se seleccionan al menos tres, preferentemente al menos cuatro, más preferentemente al menos cinco y mucho más preferentemente al menos seis antígenos del grupo de antígenos compuesto por: CT017, CT098, CT318-L1P, CT431, CT603-TSAP y CT664.

En una forma de realización preferente de la invención para la comprobación de enfermedades crónicas, los antígenos se seleccionan del grupo compuesto por: CT017, CT098, CT318-L1P, CT431, CT603-TSAP y CT664. Son preferentes para la comprobación de enfermedades o infecciones crónicas los antígenos del grupo compuesto por: CT017, CT098, CT318-L1P y CT664, son particularmente preferidos los antígenos: CT603-TSAP y CT664.

En el procedimiento de acuerdo con la invención así como en los kits de ensayo o biochips se pueden usar los polipéptidos completos o prácticamente completos. Sin embargo, también es posible utilizar fragmentos de los mismos en los ensayos. Para la averiguación de qué fragmentos son particularmente adecuados para los ensayos inmunológicos, en primer lugar se averigua, gracias a la estructura tridimensional del polipéptido o debido a transferencias de hidrofilia/hidrofobia, qué zonas del polipéptido se encuentran en la superficie y, por tanto, en contacto con el sistema inmunitario del organismo hospedador. Estos fragmentos se producen entonces en secciones de al menos 15, preferentemente al menos 20, más preferentemente al menos 30 y de forma particularmente preferente al menos 50 aminoácidos. La preparación se puede realizar mediante síntesis química o

de forma recombinante mediante expresión, por ejemplo, como polipéptido de fusión con una proteína portadora inmunológicamente inactiva. Estos fragmentos se hacen reaccionar entonces en ensayos adecuados, por ejemplo, los denominados Ensayos de Línea, ensayos ELISA o transferencias de Western con distintos sueros caracterizados lo más precisamente posible, de los que se sabe qué infección existe. En este caso es importante la determinación exacta del patógeno así como el estado actual de la infección (aguda, hace tiempo o crónica). Entonces, a partir de los resultados de ensayo se puede deducir cuál de estos fragmentos es adecuado, bastante adecuado, particularmente adecuado o no adecuado para el uso en los procedimientos de ensayo de diagnóstico.

Otra forma de realización de la invención se refiere a un procedimiento que está caracterizado por que la detección de los anticuerpos comprende la comprobación de un complejo de antígeno/anticuerpo. Una forma preferente de realización de la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para el análisis de muestras de pacientes humanos. En una forma de realización preferente del procedimiento, las muestras a examinar se someten a una lisis celular antes de que se pongan en contacto con los antígenos. Por ello se liberan los patógenos, o los antígenos específicos de patógeno, de las células infectadas.

En otra forma de realización preferente del procedimiento se realiza la detección de los anticuerpos mediante ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), transferencia de Western o ensayo de Línea, de forma particularmente preferente ELISA. En este caso es particularmente preferido el uso de ELISA, transferencia de Western y Ensayo de Línea con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, realizándose la comprobación de la reacción de antígeno-anticuerpo a través de un sustrato colorante (TMB, tetrametilbencidina).

Otra forma de realización preferente del procedimiento está caracterizada por que en el procedimiento para la comprobación selectiva de infecciones por *Chlamydia trachomatis* se determina cuantitativamente la cantidad de anticuerpos en la muestra.

En una forma de realización preferente del procedimiento se realiza la comprobación de la reacción de antígeno-anticuerpo mediante el uso de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y el sustrato colorante (TMB).

Otra forma de realización de la invención se refiere a un procedimiento para el análisis de la evolución de la enfermedad de una infección por *Chlamydia trachomatis*, en el que se toman muestras de un paciente en determinados intervalos de tiempo y las muestras se examinan según el procedimiento de acuerdo con la invención. En este caso, es preferente que en el procedimiento de acuerdo con la invención para la comprobación selectiva de infecciones por *Chlamydia trachomatis* se determine cuantitativamente la cantidad de anticuerpos en la muestra.

Además, la invención se refiere a un kit de ensayo para la comprobación selectiva de infecciones por *Chlamydia trachomatis*, caracterizado por que se usan al menos tres antígenos seleccionados del grupo compuesto por: CT017, CT098, CT318-L1P, CT431, CT456-TARP, CT603-TSAP y CT664 para detectar anticuerpos en muestras de pacientes. Se seleccionan al menos tres, más preferentemente al menos cuatro y mucho más preferentemente al menos seis antígenos de los grupos mencionados anteriormente de antígenos. En una forma de realización particularmente preferente se usa todo el grupo de los antígenos específicos de *Chlamydia trachomatis* para el procedimiento de comprobación.

Además, la invención se refiere a un biochip de los antígenos seleccionados del grupo compuesto por: CT017, CT098, CT318-L1P, CT431, CT456-TARP, CT603-TSAP y CT664 para la comprobación de anticuerpos específicos de *Chlamydia trachomatis*. Se seleccionan al menos tres, preferentemente al menos cuatro y mucho más preferentemente al menos seis antígenos de los grupos mencionados anteriormente de antígenos.

Una forma de realización del biochip se caracteriza por que los antígenos seleccionados del grupo compuesto por: CT017, CT098, CT318-L1P, CT431, CT456-TARP, CT603-TSAP y CT664 están colocados en un punto de un soporte sólido, por ejemplo de vidrio o plástico o una membrana, preferentemente una membrana y puntos sobre el soporte sólido con otros antígenos están separados espacialmente de los mismos. En este caso es más preferente que los complejos de antígeno/anticuerpo se pueden detectar o hacer visibles mediante reacciones de formación de color sobre el soporte sólido, preferentemente una membrana. Más preferentemente se realiza la comprobación mediante el uso de reacciones de formación de color, preferentemente con TMB (tetrametilbencidina) o mediante colorantes fluorescentes, tales como preferentemente colorante Cy3 o Cy5. En este caso es particularmente preferente que un colorante se una al complejo de antígeno/anticuerpo o se intercale en el mismo. Más preferente es que, de forma espacialmente separada de los puntos sobre la membrana con los antígenos de acuerdo con la invención, estén colocados otros antígenos que posibilitan una comprobación específica de *Chlamydia pneumoniae*. Para aplicaciones de biochip con superficies de biochip sólidas (plástico) se usan de forma particularmente preferente los colorantes Cy3, Cy5.

Para el procedimiento de comprobación de acuerdo con la invención se usan muestras biológicas. Estas muestras biológicas contienen los anticuerpos específicos de *Chlamydia trachomatis*. La muestra biológica puede proceder de pacientes humanos o animales, preferentemente de pacientes humanos. La muestra biológica puede ser cualquier muestra que contenga líquido corporal o tejido tal como, por ejemplo, sangre o médula ósea. Preferentemente se usa suero o plasma. Adicionalmente se prefiere que las muestras se sometan a una lisis celular antes de que se

pongan en contacto con los antígenos. El experto conoce procedimientos para la preparación de muestras para inmunoensayos. En este caso, la preparación de las muestras puede comprender, por ejemplo, la centrifugación, precipitación, concentración, filtración, dializado o dilución de la muestra. En este caso, el tipo de preparación de las muestras depende de la técnica de detección de los anticuerpos.

5 El procedimiento de acuerdo con la invención se basa en técnicas habituales conocidas por el experto de la biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología. Estas técnicas están descritas exhaustivamente en la bibliografía. A este respecto se hace referencia en particular a: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición (1989); DNA Cloning, volúmenes I y II (D. N. Glover, Ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, Ed, 10 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harnes & S. J. Higgins, Eds., 1984); Transcription And Translation (B. D. Harnes & S. J. Higgins, Eds., 1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, Ed., 1986); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); Die Serien, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc. ); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos, Eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory) , Methods in Enzymology vol. 154 y vol. 155 (Wu y Grossman o Wu), Mayer y Walker, 15 Eds. (1987), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London), Scopes, (1987), Protein Purification: Principles And Practice, segunda edición, (Springer-Verlag, N. Y.) y Handbook Of Experimental Immunology, volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, Eds, 1986).

20 La comprobación de una infección por *Chlamydia trachomatis* se realiza a través de la comprobación de anticuerpos específicos de *Chlamydia trachomatis* en las muestras mediante los antígenos de acuerdo con la invención. El término "anticuerpo" indica una inmunoglobulina o un derivado de la misma que se puede unir a los antígenos de acuerdo con la invención.

25 Los "antígenos" de acuerdo con la invención se pueden unir a los anticuerpos específicos de *Chlamydia trachomatis*. La invención se refiere a antígenos con las secuencias indicadas en las listas de secuencias y adicionalmente de forma preferente también a fragmentos inmunógenos o subsecuencias de las secuencias de aminoácidos que están indicados en las listas de secuencias y adicionalmente de forma preferente también a antígenos inmunógenos que son esencialmente iguales a las secuencias de aminoácidos de las listas de secuencias.

30 Los fragmentos o las subsecuencias adecuadas de las secuencias de aminoácidos de los antígenos habitualmente tienen una longitud de al menos 15 aminoácidos, preferentemente al menos 20 aminoácidos y más preferentemente al menos 25 aminoácidos. Para los ensayos se usan los fragmentos de los antígenos usados de acuerdo con la invención que presentan, al menos, un epítipo específico de especie diagnósticamente relevante. El experto habitual conoce distintos métodos para el cartografiado de antígenos. Mediante distintos métodos del mapeo 35 epítipo se puede determinar qué zonas son particularmente relevantes para el diagnóstico inmunológico. Los epítipos lineales se encuentran en secciones de aminoácidos cortas. Los epítipos conformacionales se producen debido a la configuración espacial del antígeno. Por tanto, los fragmentos preferidos que presentan epítipos conformacionales, por norma general, son más largos, habitualmente al menos 50 aminoácidos, preferentemente al menos 75 aminoácidos. No obstante, el experto habitual también sabe que solo algunos pocos aminoácidos participan en el epítipo. Otros aminoácidos que se encuentran, por ejemplo, en el interior del antígeno pueden estar modificados, sin que esto cambie la importancia de diagnóstico del epítipo.

45 La expresión: "antígenos que son esencialmente iguales a las secuencias de aminoácidos de las listas de secuencias" en este caso comprende secuencias de aminoácidos en las que (por ejemplo, por mutación) de 1 a 20, preferentemente de 1 a 15, más preferentemente de 1 a 10, de forma particularmente preferente de 1 a 5 y mucho más preferentemente de 1 a 3 aminoácidos se han sustituido, delecionado o añadido en comparación con las secuencias de las listas de secuencias.

50 El experto sabe que las propiedades antigénicas de una proteína o un polipéptido con frecuencia no cambian cuando uno o algunos pocos aminoácidos cambian en puntos inmunológicamente no importantes. Por tanto, se pueden cambiar fácilmente aminoácidos cuando presentan un carácter similar o no influyen o no influyen considerablemente en la estructura terciaria de la proteína. Con frecuencia, por ejemplo, también una sustitución de Gly por Ala o a la inversa no influye en el carácter inmunológico.

55 En este caso son fragmentos o subsecuencias adecuadas o antígenos "esencialmente" iguales proteínas que presentan una selectividad frente a anticuerpos específicos de *Chlamydia trachomatis*. Preferentemente, durante la realización de un procedimiento de comprobación de acuerdo con la invención de acuerdo con los ejemplos con el uso de sueros de donantes de sangre positivos sin sospecha clínica de una infección crónica por *C. trachomatis* en como máximo 3 de 6 personas, más preferentemente como máximo 2 de 6 personas y aún más preferentemente como máximo 1 de 6 personas se produce un resultado de falso positivo.

60 Los antígenos se seleccionan del grupo compuesto por CT017, CT098, CT318-L1P, CT431, CT456-TARP, CT603-TSAP y CT664 o fragmentos de los mismos. Más preferentemente, los antígenos se seleccionan del grupo compuesto por: CT017, CT098, CT318-L1 P, CT431, CT603-TSAP y CT664.

65

En una forma de realización preferente para la comprobación de enfermedades crónicas, los antígenos se seleccionan de forma particularmente preferente del grupo compuesto por: CT017, CT098, CT318-L1P, CT431, CT603-TSAP y CT664. Aún más preferentes para la comprobación de enfermedades o infecciones crónicas son los antígenos del grupo compuesto por: CT017, CT098, CT318-L1P y CT664. Más preferentes son los antígenos: CT603-TSAP y CT664.

La Tabla 1 muestra los antígenos de acuerdo con la invención con sus números de secuencia (SEC ID N°), reproduciéndose las secuencias en la lista de secuencias.

Se seleccionan al menos tres, preferentemente al menos cuatro y más preferentemente al menos seis antígenos de los grupos que se han mencionado anteriormente de antígenos. En una forma de realización particularmente preferente se usa todo el grupo de los antígenos específicos de *Chlamydia trachomatis* para el procedimiento de comprobación.

Adicionalmente a los antígenos que se han indicado anteriormente se pueden usar también otros antígenos específicos de *Chlamydia trachomatis* en el procedimiento de comprobación de acuerdo con la invención. En caso de que la detección de los complejos de antígeno/anticuerpo se realice de forma selectiva, adicionalmente y de forma simultánea se pueden usar también otros antígenos frente a otros patógenos en el mismo procedimiento de comprobación. Por ejemplo se pueden analizar los complejos de antígeno/anticuerpo de los distintos patógenos debido a diferentes propiedades espectroscópicas uno al lado del otro.

**Tabla 1.** Antígenos de *Chlamydia trachomatis* (en el caso de los números de Genbank se trata de los números bajo los cuales se pueden encontrar los genomas completos de dos aislados de *Chlamydia trachomatis*. Hasta ahora no hay una entrada independiente para los genes individuales. Estos se diferencian mediante el número de la fase de lectura abierta con CT antepuesto para *Chlamydia trachomatis* en el genoma total; sin embargo, son decisivas las listas de secuencias):

Antígeno	SEC ID N°	Número de Genbank
CT017	1	NC000117
CT098	2	NC000117
CT318-L1P	3	CP000051
CT431	4	NC000117
CT456-TARP	5	NC000117
C/603-TSAP	6	NC000117
CT664	7	NC000117

La preparación de los antígenos se puede realizar mediante procedimientos conocidos. En particular, los antígenos se pueden clonar y expresar de forma recombinante en vectores de expresión bacterianos. El experto conoce organismos adecuados para esto y estos comprenden, por ejemplo, la bacteria *Escherichia coli*. En el ejemplo 1 está descrita la preparación de los antígenos.

La comprobación de los anticuerpos se puede realizar, preferentemente, mediante inmunoensayos. En este caso se pueden usar inmunoensayos directos o indirectos. Estos ensayos comprenden, sin embargo, sin limitación: ensayos de unión competitiva, ensayos de unión no competitiva, radioinmunoensayos, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), transferencia de Western, Ensayo de Línea, ensayos de tipo sándwich, reacciones de precipitación, ensayos de inmunodifusión de difusión en gel, ensayos de aglutinación, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de inmunokuimiluminiscencia, inmunoensayos de inmuno-PCR, inmunoensayos de proteína A o proteína G e ensayos de inmunoelectroforesis.

Es particularmente ventajoso el uso de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), transferencia de Western o Ensayos de Línea, más preferentemente ELISA. Estos procedimientos se basan en interacciones de antígeno-anticuerpo, pudiéndose detectar el complejo que se produce de antígeno/anticuerpo mediante procedimientos conocidos de comprobación. En este caso es particularmente preferente el uso de procedimientos de ELISA, transferencias de Western y Ensayos de Línea con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, realizándose la comprobación de la reacción de antígeno-anticuerpo a través de un sustrato colorante (TMB).

Son particularmente adecuados los procedimientos de ensayo de ELISA en los que los antígenos están unidos a una fase sólida la mayoría de las veces de forma no covalente (interacciones hidrófobas) y se ponen en contacto con un líquido de muestra. Como fase sólida se puede usar, por ejemplo, una placa de microtitulación. La proteína (antígeno) puede interaccionar entonces con la fase sólida o con la superficie de la placa de microtitulación,



habitualmente de poliestireno, por ejemplo, con un elevado valor de pH. Más preferentemente se usa un biochip como fase sólida.

5 El experto conoce sistemas de indicador para la comprobación de los complejos de antígeno/anticuerpo. Por ejemplo, después de la formación del complejo de antígeno/anticuerpo se puede usar un segundo anticuerpo que reconoce la parte constante del primer anticuerpo o que se une de otro modo específicamente al complejo de antígeno/anticuerpo. El segundo anticuerpo o las uniones para la detección del complejo de antígeno/anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o policlonal o un fragmento del mismo, posee preferentemente una marca. Aún más preferentemente presenta una marca no radiactiva, tal como, por ejemplo, una marca enzimática, una marca fluorescente, una marca de emisión de luz, etc. De forma particularmente preferente presenta una marca enzimática tal como una fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa o peroxidasa de rábano rústicano.

15 El segundo anticuerpo puede estar acoplado, por ejemplo, a una fosfatasa alcalina, catalizando la fosfatasa alcalina entonces una transformación enzimática de cromógeno. El cromógeno incoloro se hace reaccionar entonces hasta dar un colorante y se mide. La cantidad de colorante liberado se correlaciona entonces con la cantidad del anticuerpo buscado. El experto conoce otros procedimientos de medición competitivos o no competitivos.

20 Además se pueden usar también compuestos o marcadores para la detección directa del complejo de antígeno/anticuerpo, tales como, por ejemplo, etiquetas radiactivas, fluorescentes, biológicas o enzimáticas. Es particularmente ventajoso que el complejo de antígeno/anticuerpo esté unido con el colorante y se pueda detectar el punto sobre la membrana en el que está aplicado el complejo de antígeno/anticuerpo con los antígenos de acuerdo con la invención. Esto posibilita la comprobación simultánea selectiva de diferentes patógenos de la enfermedad, por ejemplo, *Chlamydia trachomatis* o *Chlamydia pneumoniae*. Preferentemente, entonces, los resultados del ensayo se pueden evaluar ópticamente, indicando, por ejemplo, puntos con color la comprobación positiva de los patógenos de la enfermedad, cuyos antígenos se colocaron en el punto. Además, se prefiere que los complejos de antígeno/anticuerpo detectables ópticamente se diferencien en cuanto al color o en su comportamiento de absorción de longitud de onda. De este modo, los complejos de antígeno/anticuerpo, adicionalmente o en lugar de un identificador espacial, se pueden caracterizar también por su comportamiento de absorción. Se prefiere el uso de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, realizándose la comprobación de la reacción de antígeno-anticuerpo a través de un sustrato colorante (TMB) o el uso de colorantes fluorescentes, tales como Cy3 o Cy5. Todos los procedimientos para la detección del complejo de antígeno/anticuerpo se pueden usar para los procedimientos tanto con como sin biochip o soporte sólido.

35 Otra forma de realización de la invención comprende un kit de ensayo para la comprobación selectiva de infecciones por *Chlamydia trachomatis*. El kit de ensayo comprende los antígenos específicos de *Chlamydia trachomatis* que se han indicado anteriormente. La cantidad descrita en otro punto de distintos antígenos específicos de *Chlamydia trachomatis* también es adecuada para el kit de ensayo. La realización del procedimiento y las técnicas para la detección de los complejos de antígeno/anticuerpo se pueden aplicar al kit de ensayo. En particular, el kit de ensayo adicionalmente puede contener las sustancias necesarias para la detección de los complejos de antígeno/anticuerpo.

45 Además, el kit de ensayo puede comprender adicionalmente otros componentes tales como tampón de lavado o composiciones que contienen un anticuerpo específico de *Chlamydia trachomatis* como patrón. Adicionalmente, el kit de ensayo puede comprender también una placa de microtitulación o un biochip, sobre el cual están inmovilizados los anticuerpos. Además, el kit de ensayo puede contener también materiales informativos tales como, por ejemplo, una instrucción de uso que describe la preparación de las muestras y/o la especificación para la realización del ensayo.

50 Una forma de realización de la invención comprende un biochip sobre el cual están colocados los antígenos de acuerdo con la invención. La cantidad descrita en otro lugar de distintos antígenos específicos de *Chlamydia trachomatis* también es adecuada para el procedimiento con un biochip. La realización del procedimiento y las técnicas para la detección de los complejos antígeno/anticuerpo se pueden aplicar también al procedimiento con un biochip. En particular se pueden aplicar los antígenos sobre la membrana del biochip.

55 Para la membrana se pueden usar, por ejemplo, polímeros porosos de origen natural o sintéticos, vidrio, materiales cerámicos, materiales de celulosa o similares. Los materiales pueden fabricarse hasta dar una membrana, por ejemplo, a partir de películas, fibras o partículas (por ejemplo bolas que se mantienen juntas mediante materiales adhesivos o aglutinantes). De forma particularmente preferente, la membrana está compuesta de policarbonato, nitrocelulosa, acetato de celulosa, poliamida, poliéster, polivinilideno fluoruro o nylon. Más preferentemente, la membrana está compuesta de nitrocelulosa. El término "nitrocelulosa" se refiere a celulosa de éster con grupos nitrato. El término "nitrocelulosa" además comprende celulosa de éster con grupos nitrato en solitario o con una mezcla de distintos ésteres que se generaron a partir de otros ácidos como ácido de nitración, en particular ácidos carbocíclicos alifáticos. La expresión "aplicado" se refiere a que los antígenos presentan una suficiente afinidad por la membrana o incluso están unidos químicamente con la misma, de tal manera que la aplicación del líquido de muestra o de las soluciones de lavado y reacción eventualmente necesarias de forma adicional no conduce al desprendimiento de estos antígenos.

El procedimiento de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo del siguiente modo (véase también los ejemplos):

5 la primera etapa de la reacción de comprobación serológica es la inmovilización de los antígenos sobre el soporte sólido o la fase sólida, por ejemplo, la membrana de nitrocelulosa, la placa de microtitulación o el biochip. En este caso, los antígenos de acuerdo con la invención o una selección del grupo de los antígenos de acuerdo con la invención se inmovilizan, por ejemplo, mediante interacciones hidrófobas en la superficie.

10 Después de una eventual etapa de lavado, los antígenos inmovilizados se ponen entonces en contacto con el líquido de la muestra. La preparación de las muestras se puede realizar según los procedimientos que se han descrito anteriormente y tal como se ha explicado en los ejemplos, sin embargo, no está limitada a esto. Mediante la interacción de antígeno/anticuerpo, los anticuerpos específicos de *Chlamydia trachomatis* del líquido de la muestra se unen a los antígenos de acuerdo con la invención. Se forman complejos de antígeno/anticuerpo.

15 Después de un tiempo adecuado de incubación se lava el soporte sólido y se libera de los residuos de la muestra. A continuación se pone en contacto una solución para la detección del complejo de antígeno/anticuerpo con los complejos de antígeno/anticuerpo, pudiéndose realizar una detección cuantitativa o cualitativa, por ejemplo, mediante espectroscopía. En este caso se puede realizar, por ejemplo, una medición automatizada de la profundidad de color del cromógeno.

20 En una forma de realización de la invención se evalúa el curso de la enfermedad de la infección por *Chlamydia trachomatis*. Para esta forma de realización del procedimiento se puede usar también el kit de ensayo de acuerdo con la invención o el biochip de acuerdo con la invención. Para esto se ensayan al menos dos, más preferentemente al menos tres, aún más preferentemente al menos cuatro y mucho más preferentemente al menos cinco muestras del mismo paciente en diferentes momentos y se mide la presencia de *Chlamydia trachomatis* o la cantidad de los anticuerpos específicos de *Chlamydia trachomatis*. Este procedimiento puede incluir la recogida de datos a lo largo de un periodo determinado. Las muestras de los pacientes se pueden extraer en momentos regulares o irregulares, preferentemente regulares. La separación entre la extracción de dos muestras puede encontrarse entre una semana y doce meses, preferentemente entre dos semanas y cuatro meses y más preferentemente entre 4 y 6 semanas para seguir el aumento del título. Este procedimiento permite observar la progresión de la infección por *Chlamydia trachomatis*.

### **Ejemplo 1 – Identificación de los antígenos de acuerdo con la invención**

35 La identificación y caracterización de los antígenos específicos de *Chlamydia trachomatis* se llevó a cabo mediante electroforesis en gel 2D y espectrometría de masas.

40 Para esto, en primer lugar se preparó un banco de datos de expresión génica inducible para *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia trachomatis* en *Escherichia coli*. Para esto se combinaron sueros de pacientes con infecciones por *Chlamydia pneumoniae* o *Chlamydia trachomatis* aseguradas de forma clínica y microbiológica y se pre-absorbieron frente a antígenos de clamidias expresados *in vitro*. Para esto se prepararon lisados de células HeLa229 infectadas por *Chlamydia pneumoniae* en diferentes momentos de la infección.

45 Después del análisis de gráfico de colonias con los sueros pre-absorbidos de este modo se aislaron los clones reactivos y se secuenciaron los fragmentos de ADN clonados. Mediante comparación con las secuencias ya anotadas de *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia pneumoniae* se pudo aclarar la identidad de los antígenos expresados *in vivo*.

50 Con detalle, la identificación de los antígenos se realizó del siguiente modo: *Chlamydia trachomatis* serovar D/UW-3/Cx se cultivó en HeLa 229; 48-72 h después de la infección se recogieron y homogeneizaron las células. Se aisló *Chlamydia trachomatis* mediante posteriores etapas de centrifugación de los residuos celulares. Los cuerpos elementales obtenidos de *Chlamydia trachomatis* se lisaron con detergentes y se trataron con ultrasonidos. La primera etapa de la inmunoelectroforesis 2D se llevó a cabo con tiras Ready IPG, pH 3-10, 11 cm (BioRad); a continuación se llevó a cabo una SDS-PAGE con un gel de poliacrilamida al 10 %. Los geles se transfirieron para transferencia de Western o se tiñeron con azul brillante de Commassie para el análisis de nanoCL-IEN-EMEM. Las transferencias de Western se realizaron con sueros de pacientes con un cuadro clínico de una infección crónica por *Chlamydia trachomatis* con una dilución de 1: 125. Se recortaron puntos reactivos de los geles teñidos y secados de la inmunoelectroforesis 2D y se analizaron con el procedimiento de nanoCL-IEN-EMEM. A este respecto las proteínas se digirieron en los puntos con tripsina, se desalinizaron y se concentraron. El análisis de nanoCL-IEN-EMEM se llevó a cabo con el aparato Esquire 3000 plus (Bruker Daltronics). Las proteínas se identificaron mediante búsqueda de iones por EM/EM (Matrix Science) y las secuencias se compararon con bancos de datos de acceso público.

65 Las secuencias genómicas de todos los antígenos se amplificaron mediante PCR y oligodesoxinucleótidos específicos como cebadores del ADN genómico de *Chlamydia trachomatis* y los amplificados se purificaron. Los amplificados purificados se escindieron con endonucleasas de restricción adecuadas, cuyas secuencias de escisión

estaban contenidas en los cebadores de PCR, se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se ligaron en los vectores pUC8 o pDS1 que se habían escindido con las mismas endonucleasas de restricción. Se transformaron *Escherichia coli* competentes con los productos de ligación. Los clones positivos se aislaron y se caracterizaron mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN. La expresión de los antígenos se realizó en *Escherichia coli*. La expresión de los antígenos se comprobó en SDS-PAGE con tinción con azul brillante de Commassie así como en transferencia de Western con sueros humanos específicos de pacientes con anticuerpos contra *Chlamydia trachomatis*. A continuación se purificaron los antígenos mediante métodos cromatográficos.

La Tabla 2 muestra los datos de clones de los antígenos de *Chlamydia trachomatis*.

**Tabla 2.** Datos de clones de antígenos de *Chlamydia trachomatis*:

Antígeno	Vector	ER	Inserción [pb]	teoría [kDa]	Expresión [kDa]	Expresión [Cantidad]
CT017	pDS1	<i>BamHI-PstI</i>	58-1299	46	48	+++
CT098	pDS1	<i>Sall-PstI</i>	1-1707	64	66	++
CT318-L1P	pDS1	<i>BamHI-Sall</i>	1-696	26	24	+++
CT431	pUC8	<i>BamHI-PstI</i>	1-534	20	21	++
CT456-TARP	pDS1	<i>BamHI-Sall</i>	1-3015	113	>100	++
CT603-TSAP	pDS1	<i>BamHI-PstI</i>	1-585	22	23	+++
CT664	pDS1	<i>BamHI-XhoI</i> <i>Sall*</i>	1-2487	93	~100	+

Se verificó la serorreactividad de las proteínas expresadas recombinantes con los mismos sueros específicos que se emplearon para la identificación.

Para proteínas recombinantes individuales se llevó a cabo una caracterización de epítopos para identificar y delimitar epítopos específicos de especie. Esto se realizó mediante subclonación de subfragmentos individuales y análisis de la serorreactividad en transferencia de Western o mediante péptidos preparados en síntesis en fase sólida y análisis de la serorreactividad en Ensayo de Línea dependiendo de las homologías de secuencia. La serorreactividad de los antígenos identificados y los subfragmentos o péptidos específicos de especie, después, se analizó en el Ensayo de Línea para encontrar una combinación óptima de los antígenos recombinantes que posibilite, por un lado, una diferenciación entre especies exacta, por otro lado, una diferenciación entre infecciones activas y finalizadas por clamidias.

Para comprobar que aparecen anticuerpos humanos contra los antígenos CT017, CT098, CT318-L1P, CT431, CT456-TARP, CT603-TSAP y CT664, en particular con infecciones crónicas por *Chlamydia trachomatis*, se compararon los sueros de 24 pacientes con sospecha clínica de una infección crónica por *Chlamydia trachomatis* así como 6 sueros de donantes sanos de sangre con anticuerpos contra *Chlamydia trachomatis*, pero sin sospecha de una infección crónica por *Chlamydia trachomatis*.

Los resultados se compararon con los antígenos que ya se han descrito MOMP, OMP2, Hsp60 y MIP de *recomLine* de clamidia y con 4 antígenos adicionales ya descritos como serológicamente relevantes (CT089, CT795, CT813 y CT858-CPAF). Los resultados están resumidos en la Tabla 3. A este respecto, se ve que los antígenos CT017, CT089, CT318-L1P, CT431, CT603-TSAP y CT664 reaccionan particularmente con sueros de pacientes con sospecha clínica de una infección crónica por *Chlamydia trachomatis* (CT017 con el 45,8 %; CT096 con el 66,7 %; CT318 con el 58,3 %; CT431 con el 29,2 %; CT603 con el 25,0 %; CT664 con el 50,0 %), sin embargo, apenas con los sueros de los donantes sanos de sangre con anticuerpos contra *Chlamydia trachomatis*, pero sin sospecha de una infección crónica (CT017 con el 16,7 %; CT096 con el 16,7 %; CT318 con el 16,7 %; CT431 con el 16,7 %; CT603 con el 0,0 %; CT664 con el 0,0 %). A diferencia de esto, los antígenos ya conocidos MOMP, OMP2, Hsp60 y MIP son menos adecuados para diferenciar entre pacientes con sospecha clínica de una infección crónica por *Chlamydia trachomatis* (MOMP con el 91,7 %, OMP2 con el 79,2 %; HSP60 con el 54,2 %; MIP con el 62,5 %; CT089 con el 70,8 %; CT795 con el 87,5 %; CT813 con el 95,8 %; CT858 con el 37,5 %) y donantes sanos de sangre con anticuerpos contra *Chlamydia trachomatis*, pero sin sospecha de una infección crónica por *Chlamydia trachomatis* (MOMP con el 100,0 %; OMP2 con el 83,3 %; HSP60 con el 66,7 %; MIP con el 66,7 %; CT089 con el 33,3 %; CT795 con el 50,0 %; CT813 con el 100,0 %; CT858 con el 33,3 %). Los resultados ventajosos sorprendentes de los antígenos de acuerdo con la invención, por tanto, se obtienen a partir de una comparación de las columnas derecha y central de la Tabla 3.

Solamente 3 antígenos consiguieron, en todas las muestras seropositivas para *Chlamydia trachomatis* de ambos grupos, una sensibilidad muy alta de al menos el 90 % con respecto a todas las muestras (CT456-TARP con el 90,0

- %; MOMP con el 93,3 %; CT813 con el 96,7 %). El valor se calcula, por ejemplo, para CT456-TARP del siguiente modo:  $22 + 5 = 27$  dividido por  $24 + 6 = 30 \rightarrow 90$  %. No obstante, tanto MOMP como CT813 reaccionaron más frecuentemente con los sueros de los donantes sanos de sangre con anticuerpos contra *Chlamydia trachomatis*, pero sin sospecha de una infección crónica (CT813 con el 100,0 %; MOMP con el 100,0 %; en comparación CT456-TARP con el 83,3 %) que con sueros de pacientes con sospecha clínica de una infección crónica por *Chlamydia trachomatis* (CT813 con el 95,8 %; MOMP con el 91,7 %; CT456-TARP también con el 95,8 %). Esto significa que CT456-TARP presenta una mejor especificidad por sueros de pacientes con sospecha clínica de una infección crónica por *Chlamydia trachomatis* que los antígenos ya conocidos MOMP y CT813.
- 10 Los antígenos CT431, CT603 y CT664, adicionalmente, tienen una menor reactividad cruzada con *Chlamydoghila pneumoniae* que todos los demás antígenos ya conocidos.
- 15 La aplicación de diagnóstico de los antígenos CT017, CT098, CT318-L1P, CT431, CT456-TARP, CT603-TSAP y CT664, con ello, posibilita una diferenciación claramente mejor entre pacientes con sospecha clínica de una infección crónica por *Chlamydia trachomatis* y personas de ensayo sanas, pero seropositivas, de lo que es el caso con los antígenos conocidos actualmente.

**Tabla 3.** Caracterización serológica de los antígenos de *Chlamydia trachomatis* de acuerdo con la invención

Antígeno	Sueros positivos para <i>C. pneumoniae</i> sin sospecha de una infección por <i>C. trachomatis</i>		Sueros de pacientes con sospecha clínica de una infección crónica por <i>C. trachomatis</i>		Sueros de donantes de sangre positivos a <i>C. trachomatis</i> sin sospecha clínica de una infección crónica por <i>C. trachomatis</i>	
	n=20		n=24		n = 6	
	n	%	n	%	n	%
CT017	4	20,0	11	45,8	1	16,7
CT098	1	5,0	16	66,7	1	16,7
CT318	4	20,0	14	58,3	1	16,7
CT431	0	0,0	7	29,2	1	16,7
CT456	3	15,0	22	91,7	5	83,3
CT603	0	0,0	6	25,0	0	0,0
CT664	0	0,0	12	50,0	0	0,0
MOMP	1	5,0	22	91,7	6	100,0
OMP2	2	10,0	19	79,2	5	83,3
HSP60	3	15,0	13	54,2	4	66,7
MIP	3	15,0	15	62,5	4	66,7
CT089	3	15,0	17	70,8	2	33,3
CT795	2	10,0	21	87,5	3	50,0
CT813	7	35,0	23	95,8	6	100,0
CT858	1	5,0	9	37,5	2	33,3

20

**Ejemplo 2 – Realización del procedimiento de ensayo**

- La expresión de los antígenos se realizó en *Escherichia coli*, cultivada en matraces de agitación o en un fermentador. Las bacterias se recogieron mediante centrifugación y se lisaron mediante detergentes y tratamiento con ultrasonidos. Después, los antígenos estaban presentes en parte en "cuerpos de inclusión" o de forma soluble. Los antígenos existentes en "cuerpos de inclusión" se solubilizaron con urea.
- 25

A continuación se purificaron paso a paso los antígenos con métodos cromatográficos, particularmente intercambio aniónico y catiónico. Los antígenos purificados se aplicaron en diluciones halladas empíricamente sobre un gel de

poliacrilamida y se separaron por tamaño en el campo eléctrico. Después de la electroforesis en gel se transfirieron los antígenos en el campo eléctrico sobre una membrana de nitrocelulosa y, de este modo, se inmovilizaron sobre la membrana.

- 5 Sin embargo, la aplicación sobre la membrana se puede realizar también directamente mediante pulverización sobre la membrana de nitrocelulosa de diluciones establecidas empíricamente de los antígenos purificados. Las membranas se trataron después de la transferencia con una solución que contenía proteínas para saturar los puntos de unión a proteína todavía no ocupados sobre la membrana de nitrocelulosa.
- 10 A continuación se secaron las membranas y se cortaron en tiras. Respectivamente una tira, a continuación, se incubó con un suero humano en una dilución de 1:250 durante una noche a temperatura ambiente con agitación suave. A este respecto, los anticuerpos en el suero del paciente se unen a los antígenos inmovilizados sobre la membrana de nitrocelulosa.
- 15 A continuación, las tiras de membrana de nitrocelulosa se lavaron 3 x y después se incubaron durante 60 min con un anticuerpo secundario que estaba conjugado con peroxidasa de rábano rústico.

- A continuación se lavaron nuevamente 3 x las tiras de membrana de nitrocelulosa y después se trataron con una solución de TMB (tetrametilbencidina). En los puntos en los que estaban inmovilizados los antígenos que habían reaccionado con los anticuerpos del paciente se produjo después una precipitación de color sobre las tiras de membrana de nitrocelulosa. A continuación se secaron las tiras y se analizaron las tinciones (Tabla 3).
- 20

### Ejemplo 3 – Reactividad de subsecuencias

- 25 En total se seleccionaron 22 péptidos de, respectivamente, 20 aminoácidos de las secuencias de los antígenos, se sintetizaron y se ensayaron en dos experimentos en ELISA (adsorción directa de los péptidos a la placa de microtitulación o unión covalente a la placa de microtitulación) con sueros positivos a *Chlamydia trachomatis*. Las secuencias de los péptidos, las posiciones en las proteínas totales y los resultados están resumidos en la Tabla 4. Por antígeno ha reaccionado, respectivamente, al menos uno de estos péptidos con al menos un suero.
- 30

Tabla 4

SEC ID Nº	Péptido	Posición	Secuencia	Unión por absorción (n =5)	Unión covalente *) (n = 5)
8	CT017-1	P262 -V281	PAVEETPVVTKTEEQKVTTV	0	1
9	CT017-2	M348 -E367	MESFYRDEQKKRVLGTGELE	0	n. d.
10	CT017-3	V368 -D387	VYPHIVKNNPGDYLLKNGED	0	1
11	CT098-1	S162 -E181	SQIDNKKIKNLDDYVGKVCE	1	0
12	CT098-2	T252 -V271	TWKRIRHPSEMVELNQELEV	0	2
13	CT098-3	Q289 -V308	QKEHNPWEDIEKKYPPGKRV	0	1
14	CT098-4	F550 -D570	FLVHGGDAGHDAEEESSDRD	0	2
15	CT318-1	M001 -S020	MTKHGKRIRGIQETYDLAKS	1	1
16	CT318-2	I050 - T069	IDPRKSDQQIRGSVSLPHGT	0	0
17	CT318-3	P138 -R157	PTPKAGTVTTDVVKTVAELR	0	0
18	CT431-1	E005 - I024	EMMHKLQDVIDRKLDSRRI	0	0
19	CT431-2	A101 -S120	AVPGRRFATPHARIMIHQPS	1	3
20	CT431-3	E152 -M171	EATGQSREVIEKAIDRDMWM	1	n. d.
21	CT-456-1	T103 - I122	TSPDTSESSETSSSTSSSDHI	3	n. d.
22	CT-456-2	S273 -A292	SIGGSRTSGPENTSDGAAAA	1	0
23	CT-456-3	S454 -D473	<b>SQEASSGYTPSAWRRGHRVD</b>	1	2
24	CT-456-4	1569 -A588	INTNNQTDINTTDKSDGA	0	n. d.

25	CT-456-5	T598 -N617	TESSSGDDSGSVSSSESDKN	0	3
26	CT-456-6	S721 -T740	SSGDESGGVSSPSESNKNT	0	n. d.
27	CT603-1	G006 - I025	GRQAPDFSGKAVVCGEEKEI	0	n. d.
28	CT603-2	A087 -F106	ARNAGGIEGTEYPLLADPSF	0	3
29	CT603-3	N172 -F191	<b>NWRSGERGMVPSEEGKEYF</b>	0	n. d.

\*) En la unión covalente no se pudieron ensayar todos los péptidos, ya que algunos se pudieron disolver solo en urea 8 M, sin embargo, la urea altera la unión covalente.

**Ejemplo 4 – Caracterización serológica de los antígenos de *C. trachomatis*: sueros reactivos con los antígenos**

5 Se ensayaron distintos sueros con un Ensayo de Línea para clamidias y los resultados de los antígenos se compararon con los nuevos antígenos. A este respecto se mostró que todos los nuevos antígenos posibilitan una mejor discriminación entre sueros de pacientes con infecciones clínicamente relevantes por *Chlamydia trachomatis* en comparación con sueros de donantes de sangre seropositivos, sin embargo, clínicamente inaparentes. Los resultados están resumidos en la Tabla 5.

10 Los resultados reproducidos en la Tabla 5 se corresponden sustancialmente con los resultados de la Tabla 3, sin embargo, se forma un cociente de los valores individuales que aclara la fuerza informativa de los antígenos.

**Tabla 5**

15

Antígeno	Sueros positivos a <i>C. pneumoniae</i> sin sospecha de una infección por <i>C. trachomatis</i>		Sueros de pacientes con sospecha clínica de una infección crónica por <i>C. trachomatis</i>		Sueros de donantes de sangre positivos a <i>C. trachomatis</i> sin sospecha clínica de una infección crónica por <i>C. trachomatis</i>		Especificidad para infecciones clínicamente relevantes
	n=20		n=24		n = 6		
	N	%	n	%	N	%	%
CT017	4	20,0	11	45,8	1	16,7	73,3
CT098	1	5,0	16	66,7	1	16,7	80,0
CT318	4	20,0	14	58,3	1	16,7	77,8
CT431	0	0,0	7	29,2	1	16,7	63,6
CT456	3	15,0	22	91,7	5	83,3	52,4
CT603	0	0,0	6	25,0	0	0,0	100,0
MOMP*	1	5,0	22	91,7	6	100,0	47,8
OMP2*	2	10,0	19	79,2	5	83,3	48,7
HSP60*	3	15,0	13	54,2	4	66,7	44,8
MIP*	3	15,0	15	62,5	4	66,7	48,4

\* Los antígenos MOMP, OMP2, HSP60 y MIP se usan en el *recomLine* de clamidia y son conocidos por el estado de la técnica.

20 La especificidad de infecciones clínicamente relevantes se calculó como cociente del porcentaje de los sueros reconocidos de pacientes con sospecha clínica de una infección crónica por *C. trachomatis* así como la suma de los porcentajes de los sueros reconocidos de pacientes con sospecha clínica de una infección crónica por *C. trachomatis* y los sueros de donantes de sangre positivos a *C. trachomatis* sin sospecha clínica de una infección crónica por *C. trachomatis*. A este respecto, todos los nuevos antígenos tienen una mayor especificidad para infecciones clínicamente relevantes (>50 % en comparación con <50 % para los antígenos ya conocidos) que los antígenos ya conocidos usados en el *recomLine* de clamidia.

Los antígenos CT431 y CT603 tienen, adicionalmente, una menor reactividad cruzada con *C. pneumoniae* que todos los antígenos ya conocidos.

## 5 Ejemplo 5 – Preparación de un biochip

Los antígenos se aplicaron mediante un procedimiento de dispensación sin contacto (AD3050, Biodot) sobre un chip de plástico de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de tamaño que está compuesto, por ejemplo, de policarbonato o poliestireno con superficie correspondientemente activada. La separación entre los puntos de antígeno individuales asciende a 1,125 mm. En total se pueden aplicar hasta 99 antígenos sobre el biochip. Como antígenos se aplican sobre el biochip los antígenos CT017, CT098, CT318-L1P, CT431, CT456-TARP, CT603-TSAP y CT664 de *Chlamydia trachomatis*. Adicionalmente se pueden aplicar sobre el biochip antígenos, por ejemplo, de *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia psittaci* para aclarar el estado de infecciones por clamidias patógenas para los seres humanos.

Además se pueden aplicar adicionalmente, por ejemplo, también antígenos de las bacterias *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi*, *Streptococcus pyogenes*, los virus parvovirus B19 y virus de Epstein-Barr así como de antígenos autoinmunitarios humanos para diagnosticar artritis reactiva o dependiente de infección y delimitar la misma de enfermedades autoinmunitarias. Además se pueden aplicar para otras cuestiones otros antígenos o combinaciones de los mismos con otros antígenos sobre el biochip.

El biochip se introduce en un cartucho de plástico. El cartucho de plástico forma un sistema cerrado con los componentes: cuerpos de cartucho con recipiente de suero y canales microfluídicos, chip de plástico con antígenos inmovilizados, lámina de cubrición para el sellado del cartucho y tabique elástico para el acoplamiento fluido a un procesador de ensayo que bombea las soluciones de reactivo requeridas, tales como tampón, conjugados de colorantes fluorescente y medios de acondicionamiento, al cartucho del biochip.

En la primera etapa del desarrollo del ensayo se carga el recipiente de suero del cartucho con suero diluido y el cartucho con el biochip integrado se introduce en el procesador de ensayo y se aspira el suero uniformemente a través de la serie de puntos. Después de la incubación del suero se realiza la reacción de los anticuerpos unidos con los conjugados de colorante fluorescente. Tanto después de la incubación del suero como del conjugado un ciclo de enjuagado sirve para la retirada de los restos no unidos de suero o de conjugado. A continuación se evalúa cuantitativamente la fluorescencia en un lector de fluorescencia mediante espectroscopía de fluorescencia. Mediante el uso de conjugados de colorante con diferentes inmunoglobulinas, por ejemplo, IgG anti-ser humano e IgM anti-ser humano se pueden comprobar cuantitativamente diferentes clases de inmunoglobulinas que están presentes en diferentes estadios de la infección en diferentes cantidades.

## Ejemplo 6 – Realización del procedimiento de ensayo con un biochip

El procedimiento de ensayo de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo también mediante el uso de un biochip. La realización del procedimiento se realiza de forma análoga al ejemplo 2, realizándose la inmovilización de los antígenos sobre un biochip.

A este respecto, la superficie del biochip sobre la cual se inmovilizan los antígenos puede estar compuesta de una membrana de nitrocelulosa, sin embargo, también de plástico activado (por ejemplo, poliestireno, policarbonato, cerámica) o vidrio activado. Los antígenos se pueden pulverizar con un aparato de dispensación, por ejemplo, BioDot AD3050 automáticamente de forma directa sobre la superficie del biochip.

Después de la inmovilización de los antígenos sobre el biochip, los biochips se tratan con una solución que contiene proteínas para saturar los puntos de unión a proteína todavía no ocupados sobre la superficie del biochip. El procedimiento de ensayo adicional se realiza de forma análoga al procesamiento de las tiras de membrana de nitrocelulosa, tal como se ha descrito en el ejemplo 2.

La comprobación de la reacción antígeno-anticuerpo se puede realizar adicionalmente a la coloración con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa y el sustrato colorante TMB también con un anticuerpo secundario al cual está conjugado un colorante fluorescente. Entonces se puede determinar la fluorescencia en un detector de fluorescencia, por ejemplo, Tecan LS 200.

## Listado de secuencias

- 60 <110> MIKROGEN molekularbiologische Entwicklungs-GmbH
- <120> Procedimiento, kit de ensayo y biochip para la comprobación selectiva de infecciones por *Chlamydia trachomatis*
- 65 <130> MIKROGEN

<160> 29

<170> PatentIn versión 3.5

5

<210> 1

<211> 433

<212> PRT

<213> *Chlamydia trachomatis*

10

<400> 1

Met Leu Ile Phe Ala Leu Ser Phe Gly Ala Asp Ala Cys Leu Cys Ala  
 1 5 10  
 Ala Asp Leu Ser Lys Ala Lys Val Glu Ala Ser Val Gly Asp Arg Ala  
 20 25 30  
 Ala Phe Ser Pro Phe Thr Gly Glu Ile Lys Gly Asn Arg Val Arg Leu  
 35 40 45  
 Arg Leu Ala Pro His Thr Asp Ser Phe Ile Ile Lys Glu Leu Ser Lys  
 50 55 60  
 Gly Asp Cys Leu Ala Val Leu Gly Glu Ser Lys Asp Tyr Tyr Val Val  
 65 70 75 80  
 Ala Ala Pro Glu Gly Val Arg Gly Tyr Val Phe Arg Thr Phe Val Leu  
 85 90 95  
 Asp Asn Val Ile Glu Gly Glu Lys Val Asn Val Arg Leu Glu Pro Ser  
 100 105 110  
 Thr Ser Ala Pro Ile Leu Ala Arg Leu Ser Lys Gly Thr Val Val Lys  
 115 120 125  
 Thr Leu Gly Ala Ala Gln Gly Lys Trp Ile Glu Ile Ala Leu Pro Lys  
 130 135 140  
 Gln Cys Val Phe Tyr Val Ala Lys Asn Phe Val Lys Asn Val Gly Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Asp Leu Tyr Asn Gln Lys Glu Gly Gln Lys Lys Leu Ala Leu Asp  
 165 170 175  
 Leu Leu Ser Ser Ala Met Asp Phe Ala Asp Ala Glu Leu Gln Lys Lys  
 180 185 190



Ile Glu Asp Ile Asp Leu Asp Ala Ile Tyr Lys Lys Met Asn Leu Ala  
 195 200 205

Gln Ser Glu Glu Phe Lys Asp Val Pro Gly Leu Gln Ser Leu Val Gln  
 210 215 220

Lys Ala Leu Glu Arg Val Gln Glu Ala Phe Leu Ala Lys Ser Leu Glu  
 225 230 235 240

Lys Ser Ser Val Lys Val Pro Glu Ile Arg His Lys Val Leu Glu Glu  
 245 250 255

Ile Ala Val Val Ser Pro Ala Val Glu Glu Thr Pro Val Val Thr Lys  
 260 265 270

Thr Glu Glu Gln Lys Val Thr Thr Val Pro Val Pro Ala Pro Ala Val  
 275 280 285

Val Thr Glu Pro Ala Gln Asp Leu Ser Ser Val Lys Gly Ser Leu Leu  
 290 295 300

Ser His Tyr Ile Arg Lys Lys Gly Phe Val Lys Ala Ser Pro Val Ile  
 305 310 315 320

Glu Gly Arg Glu Ser Phe Glu Arg Ser Leu Phe Ala Val Trp Leu Ser  
 325 330 335

Leu Gln Pro Glu Glu Ile Arg His Gln Leu Thr Met Glu Ser Phe Tyr  
 340 345 350

Arg Asp Glu Gln Lys Lys Lys Arg Val Leu Thr Gly Glu Leu Glu Val  
 355 360 365

Tyr Pro His Ile Val Lys Asn Asn Pro Gly Asp Tyr Leu Leu Lys Asn  
 370 375 380

Gly Glu Asp Val Val Ala Phe Val Tyr Ala Thr Ser Ile Asp Leu Ser  
 385 390 395 400

Lys Trp Leu Gly Lys Ser Val Val Leu Glu Cys Val Ser Arg Pro Asn  
 405 410 415

Asn His Phe Ala Phe Pro Ala Tyr Ile Val Leu Ser Val Lys Glu Gly  
 420 425 430

Ala

- <210> 2
- <211> 569
- <212> PRT
- <213> *Chlamydia trachomatis*
- <400> 2

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





Leu Val Asn Phe Thr Ile Ser Ser Thr Met Gly Pro Gly Val Thr Val  
 210 215 220

Asp Thr Arg Glu Leu Ile Ala Leu  
 225 230

<210> 4  
 <211> 192  
 <212> PRT  
 <213> *Chlamydia trachomatis*

5

<400> 4

Met Pro Glu Gly Glu Met Met His Lys Leu Gln Asp Val Ile Asp Arg  
 1 5 10 15

Lys Leu Leu Asp Ser Arg Arg Ile Phe Phe Ser Glu Pro Val Thr Glu  
 20 25 30

Lys Ser Ala Thr Glu Ala Ile Lys Lys Leu Trp Tyr Leu Glu Leu Thr  
 35 40 45

Asn Pro Gly Gln Pro Ile Val Phe Val Ile Asn Ser Pro Gly Gly Ser  
 50 55 60

Val Asp Ala Gly Phe Ala Val Trp Asp Gln Ile Lys Met Ile Ser Ser  
 65 70 75 80

Pro Leu Thr Thr Val Val Thr Gly Leu Ala Ala Ser Met Gly Ser Val  
 85 90 95

Leu Ser Leu Cys Ala Val Pro Gly Arg Arg Phe Ala Thr Pro His Ala  
 100 105 110

Arg Ile Met Ile His Gln Pro Ser Ile Gly Gly Thr Ile Thr Gly Gln  
 115 120 125

Ala Thr Asp Leu Asp Ile His Ala Arg Glu Ile Leu Lys Thr Lys Ala  
 130 135 140

Arg Ile Ile Asp Val Tyr Val Glu Ala Thr Gly Gln Ser Arg Glu Val  
 145 150 155 160

Ile Glu Lys Ala Ile Asp Arg Asp Met Trp Met Ser Ala Asn Glu Ala  
 165 170 175

Met Glu Phe Gly Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ser Phe Asn Asp Leu  
 180 185 190

10

<210> 5  
 <211> 1005  
 <212> PRT  
 <213> *Chlamydia trachomatis*

15

<400> 5

Met Thr Asn Ser Ile Ser Gly Tyr Gln Pro Thr Val Thr Thr Ser Thr  
1 5 10 15

Ser Ser Thr Thr Ser Ala Ser Gly Ala Ser Gly Ser Leu Gly Ala Ser  
20 25 30

Ser Val Ser Thr Thr Ala Asn Ala Thr Val Thr Gln Thr Ala Asn Ala  
35 40 45

Thr Asn Ser Ala Ala Thr Ser Ser Ile Gln Thr Thr Gly Glu Thr Val  
50 55 60

Val Asn Tyr Thr Asn Ser Ala Ser Ala Pro Asn Val Thr Val Ser Thr  
65 70 75 80

Ser Ser Ser Ser Thr Gln Ala Thr Ala Thr Ser Asn Lys Thr Ser Gln  
85 90 95

Ala Val Ala Gly Lys Ile Thr Ser Pro Asp Thr Ser Glu Ser Ser Glu  
100 105 110

Thr Ser Ser Thr Ser Ser Ser Asp His Ile Pro Ser Asp Tyr Asp Asp  
115 120 125

Val Gly Ser Asn Ser Gly Asp Ile Ser Asn Asn Tyr Asp Asp Val Gly  
130 135 140

Ser Asn Asn Gly Asp Ile Ser Ser Asn Tyr Asp Asp Ala Ala Ala Asp  
145 150 155 160

Tyr Glu Pro Ile Arg Thr Thr Glu Asn Ile Tyr Glu Ser Ile Gly Gly  
165 170 175

Ser Arg Thr Ser Gly Pro Glu Asn Thr Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ala  
180 185 190

Leu Asn Ser Leu Arg Gly Ser Ser Tyr Ser Asn Tyr Asp Asp Ala Ala  
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Thr Thr Glu Asn Ile Tyr Glu Ser Ile  
210 215 220

Gly Gly Ser Arg Thr Ser Gly Pro Glu Asn Thr Ser Gly Gly Ala Ala  
225 230 235 240

Ala Ala Leu Asn Ser Leu Arg Gly Ser Ser Tyr Ser Asn Tyr Asp Asp  
245 250 255

Ala Ala Ala Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Thr Thr Glu Asn Ile Tyr Glu  
 260 265 270

Ser Ile Gly Gly Ser Arg Thr Ser Gly Pro Glu Asn Thr Ser Asp Gly  
 275 280 285

Ala Ala Ala Ala Ala Leu Asn Ser Leu Arg Gly Ser Ser Tyr Thr Thr  
 290 295 300

Gly Pro Arg Asn Glu Gly Val Phe Gly Pro Gly Pro Glu Gly Leu Pro  
 305 310 315 320

Asp Met Ser Leu Pro Ser Tyr Asp Pro Thr Asn Lys Thr Ser Leu Leu  
 325 330 335

Thr Phe Leu Ser Asn Pro His Val Lys Ser Lys Met Leu Glu Asn Ser  
 340 345 350

Gly His Phe Val Phe Ile Asp Thr Asp Arg Ser Ser Phe Ile Leu Val  
 355 360 365

Pro Asn Gly Asn Trp Asp Gln Val Cys Ser Ile Lys Val Gln Asn Gly  
 370 375 380

Lys Thr Lys Glu Asp Leu Asp Ile Lys Asp Leu Glu Asn Met Cys Ala  
 385 390 395 400

Lys Phe Cys Thr Gly Phe Ser Lys Phe Ser Gly Asp Trp Asp Ser Leu  
 405 410 415

Val Glu Pro Met Val Ser Ala Lys Ala Gly Val Ala Ser Gly Gly Asn  
 420 425 430

Leu Pro Asn Thr Val Ile Ile Asn Asn Lys Phe Lys Thr Cys Val Ala  
 435 440 445

Tyr Gly Pro Trp Asn Ser Gln Glu Ala Ser Ser Gly Tyr Thr Pro Ser  
 450 455 460

Ala Trp Arg Arg Gly His Arg Val Asp Phe Gly Gly Ile Phe Glu Lys  
 465 470 475 480

Ala Asn Asp Phe Asn Lys Ile Asn Trp Gly Thr Gln Ala Gly Pro Ser  
 485 490 495

Ser Glu Asp Asp Gly Ile Ser Phe Ser Asn Glu Thr Pro Gly Ala Gly  
 500 505 510

Pro Ala Ala Ala Pro Ser Pro Thr Pro Ser Ser Ile Pro Ile Ile Asn  
 515 520 525

Val Asn Val Asn Val Gly Gly Thr Asn Val Asn Ile Gly Asp Thr Asn  
 530 535 540  
 Val Asn Thr Thr Asn Thr Thr Pro Thr Thr Gln Ser Thr Asp Ala Ser  
 545 550 555 560  
 Thr Asp Thr Ser Asp Ile Asp Asp Ile Asn Thr Asn Asn Gln Thr Asp  
 565 570 575  
 Asp Ile Asn Thr Thr Asp Lys Asp Ser Asp Gly Ala Gly Gly Val Asn  
 580 585 590  
 Gly Asp Ile Ser Glu Thr Glu Ser Ser Ser Gly Asp Asp Ser Gly Ser  
 595 600 605  
 Val Ser Ser Ser Glu Ser Asp Lys Asn Ala Ser Val Gly Asn Asp Gly  
 610 615 620  
 Pro Ala Met Lys Asp Ile Leu Ser Ala Val Arg Lys His Leu Asp Val  
 625 630 635 640  
 Val Tyr Pro Gly Glu Asn Gly Gly Ser Thr Glu Gly Pro Leu Pro Ala  
 645 650 655  
 Asn Gln Thr Leu Gly Asp Val Ile Ser Asp Val Glu Asn Lys Gly Ser  
 660 665 670  
 Ala Gln Asp Thr Lys Leu Ser Gly Asn Thr Gly Ala Gly Asp Asp Asp  
 675 680 685  
 Pro Thr Thr Thr Ala Ala Val Gly Asn Gly Ala Glu Glu Ile Thr Leu  
 690 695 700  
 Ser Asp Thr Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asp Val Ser Asp Thr Ala Ser  
 705 710 715 720  
 Ser Ser Gly Asp Glu Ser Gly Gly Val Ser Ser Pro Ser Ser Glu Ser  
 725 730 735  
 Asn Lys Asn Thr Ala Val Gly Asn Asp Gly Pro Ser Gly Leu Asp Ile  
 740 745 750  
 Leu Ala Ala Val Arg Lys His Leu Asp Lys Val Tyr Pro Gly Asp Asn  
 755 760 765  
 Gly Gly Ser Thr Glu Gly Pro Leu Gln Ala Asn Gln Thr Leu Gly Asp  
 770 775 780  
 Ile Val Gln Asp Met Glu Thr Thr Gly Thr Ser Gln Glu Thr Val Val  
 785 790 795 800



Ser Pro Trp Lys Gly Ser Thr Ser Ser Thr Glu Ser Ala Gly Gly Ser  
 805 810 815

Gly Ser Val Gln Thr Leu Leu Pro Ser Pro Pro Pro Thr Pro Ser Thr  
 820 825 830

Thr Thr Leu Arg Thr Gly Thr Gly Ala Thr Thr Thr Ser Leu Met Met  
 835 840 845

Gly Gly Pro Ile Lys Ala Asp Ile Ile Thr Thr Gly Gly Gly Gly Arg  
 850 855 860

Ile Pro Gly Gly Gly Thr Leu Glu Lys Leu Leu Pro Arg Ile Arg Ala  
 865 870 875 880

His Leu Asp Ile Ser Phe Asp Ala Gln Gly Asp Leu Val Ser Thr Glu  
 885 890 895

Glu Pro Gln Leu Gly Ser Ile Val Asn Lys Phe Arg Gln Glu Thr Gly  
 900 905 910

Ser Arg Gly Ile Leu Ala Phe Val Glu Ser Ala Pro Gly Lys Pro Gly  
 915 920 925

Ser Ala Gln Val Leu Thr Gly Thr Gly Gly Asp Lys Gly Asn Leu Phe  
 930 935 940

Gln Ala Ala Ala Ala Val Thr Gln Ala Leu Gly Asn Val Ala Gly Lys  
 945 950 955 960

Val Asn Leu Ala Ile Gln Gly Gln Lys Leu Ser Ser Leu Val Asn Asp  
 965 970 975

Asp Gly Lys Gly Ser Val Gly Arg Asp Leu Phe Gln Ala Ala Ala Gln  
 980 985 990

Thr Thr Gln Val Leu Ser Ala Leu Ile Asp Thr Val Gly  
 995 1000 1005

<210> 6  
 <211> 195  
 <212> PRT  
 <213> *Chlamydia trachomatis*  
 <400> 6

Met Gly Ser Leu Val Gly Arg Gln Ala Pro Asp Phe Ser Gly Lys Ala  
 1 5 10 15

Val Val Cys Gly Glu Glu Lys Glu Ile Ser Leu Ala Asp Phe Arg Gly  
 20 25 30

Lys Tyr Val Val Leu Phe Phe Tyr Pro Lys Asp Phe Thr Tyr Val Cys

5

10



Leu Lys Asp Gly Val Ser Phe Val Met Gly Ser Cys Gln Val Ser Phe  
 85 90 95  
 Phe Lys Gly Glu Glu Val Glu Gly Asp Ile Glu Leu Ser Phe Gln Thr  
 100 105 110  
 Glu Gly Gly Asn Glu Gly Glu Pro Ala Ala Gln Gly Ser Ser Ser Val  
 115 120 125  
 Ser Ser Glu Ala Pro Lys Lys Glu Thr Gly Asn Pro Ser Leu Pro Ser  
 130 135 140  
 Glu Ala Lys Ala Ser Gly Glu Val Ser Ser Ser Ala Ile Ala Lys Glu  
 145 150 155 160  
 Gln Glu Leu Ala Ala Ser Phe Leu Ala Ser Val Glu Lys Glu Pro Gly  
 165 170 175  
 Thr Pro Lys Glu Val Ser Glu Pro Lys Val Ser Ser Gln Glu Gly Gln  
 180 185 190  
 Thr Pro Ser Val Thr Gly Glu Lys Lys Asp Leu Glu Leu Pro Leu Ala  
 195 200 205  
 Ser Gln Glu Gln Pro Lys Gln Thr Thr Pro Ser Gly Ser Gly Glu Pro  
 210 215 220  
 Thr Gln Ser Gln Asn Ala Ser Met Glu Glu Asn Arg Thr Ser Pro Asp  
 225 230 235 240  
 Gln Asn Gln Gln Pro Gln Leu Ser Ser Ala Ser Glu Ser Gly Ser Gln  
 245 250 255  
 Ser Pro Glu Asn Gln Glu Gln Gln Pro Ser Gln Thr Pro Pro Pro Ser  
 260 265 270  
 Pro Glu Thr Pro Glu Pro Ser Gly Glu Pro Asn Ser Ala Thr Glu Glu  
 275 280 285  
 Asn Ser Pro Ser Pro Met Glu Lys Ala Ser Val Thr Glu Glu Gly Ser  
 290 295 300  
 Ser Gly Thr Ser Glu Glu Glu Lys Glu Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu  
 305 310 315 320  
 Ser Ala Ala Asn Glu Glu Pro Lys Ala Glu Ala Ser Gln Glu Glu Glu  
 325 330 335  
 Lys Lys Glu Glu Asp Lys Gly Glu Val Leu Ala Pro Phe Asn Val Gln  
 340 345 350

Asp Leu Phe Arg Phe Asp Gln Gly Ile Phe Pro Ala Glu Ile Glu Asp  
 355 360 365  
 Leu Ala Gln Lys Gln Val Ala Val Asp Leu Thr Gln Pro Ser Arg Phe  
 370 375 380  
 Leu Leu Lys Val Leu Ala Gly Ala Asn Ile Gly Ala Glu Phe His Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Ser Gly Lys Thr Tyr Ile Val Gly Ser Asp Pro Gln Val Ala Asp  
 405 410 415  
 Ile Val Leu Ser Asp Met Ser Ile Ser Arg Gln His Ala Lys Ile Ile  
 420 425 430  
 Ile Gly Asn Asp Asn Ser Val Leu Ile Glu Asp Leu Gly Ser Lys Asn  
 435 440 445  
 Gly Val Ile Val Glu Gly Arg Lys Ile Glu His Gln Ser Thr Leu Ser  
 450 455 460  
 Ala Asn Gln Val Val Ala Leu Gly Thr Thr Leu Phe Leu Leu Val Asp  
 465 470 475 480  
 Tyr Ala Ala Pro Ser Asp Thr Val Met Ala Thr Ile Ser Ser Glu Asp  
 485 490 495  
 Tyr Gly Leu Phe Gly Arg Pro Gln Ser Pro Glu Glu Ile Ala Ala Arg  
 500 505 510  
 Ala Ala Glu Glu Glu Glu Glu Lys Arg Lys Arg Ala Thr Leu Pro Thr  
 515 520 525  
 Gly Ala Phe Ile Leu Thr Leu Phe Ile Gly Gly Leu Ala Leu Leu Phe  
 530 535 540  
 Gly Ile Gly Thr Ala Ser Leu Phe His Thr Lys Glu Val Val Ser Ile  
 545 550 555 560  
 Asp Gln Ile Asp Leu Ile His Asp Ile Glu His Val Ile Gln Gln Phe  
 565 570 575  
 Pro Thr Val Arg Phe Thr Phe Asn Lys Asn Asn Gly Gln Leu Phe Leu  
 580 585 590  
 Ile Gly His Val Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ser Glu Leu Leu Tyr Lys  
 595 600 605  
 Val Asp Ala Leu Ser Phe Val Lys Ser Val Asp Asp Asn Val Ile Asp  
 610 615 620

Asp Glu Ala Val Trp Gln Glu Met Asn Ile Leu Leu Ser Lys Asn Pro  
625 630 635 640

Glu Phe Lys Gly Ile Ser Met Gln Ser Pro Glu Pro Gly Ile Phe Val  
645 650 655

Ile Ser Gly Tyr Leu Lys Thr Glu Glu Gln Ala Ala Cys Leu Ala Asp  
660 665 670

Tyr Leu Asn Leu His Phe Asn Tyr Leu Ser Leu Leu Asp Asn Lys Val  
675 680 685

Ile Ile Glu Ser Gln Val Met Lys Ala Leu Ala Gly His Leu Val Gln  
690 695 700

Ser Gly Phe Ala Asn Val His Val Ser Phe Thr Asn Gly Glu Ala Val  
705 710 715 720

Leu Thr Gly Tyr Ile Asn Asn Lys Asp Ala Asp Lys Phe Arg Thr Val  
725 730 735

Val Gln Glu Leu Gln Asp Ile Ala Gly Ile Arg Ala Val Lys Asn Phe  
740 745 750

Val Val Leu Leu Pro Ala Glu Glu Gly Val Ile Asp Leu Asn Met Arg  
755 760 765

Tyr Pro Gly Arg Tyr Arg Val Thr Gly Phe Ser Lys Cys Gly Asp Ile  
770 775 780

Ser Ile Asn Val Val Val Asn Gly Arg Ile Leu Thr Arg Gly Asp Ile  
785 790 795 800

Leu Asp Gly Met Thr Val Thr Ser Ile Gln Ser His Cys Ile Phe Leu  
805 810 815

Glu Arg Glu Gly Leu Lys Tyr Lys Ile Glu Tyr Asn Lys  
820 825

<210> 8  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> péptido

<400> 8

Pro Ala Val Glu Glu Thr Pro Val Val Thr Lys Thr Glu Glu Gln Lys  
1 5 10 15

Val Thr Thr Val  
20

<210> 9  
<211> 20  
<212> PRT

<213> artificial

<400> 9

Met Glu Ser Phe Tyr Arg Asp Glu Gln Lys Lys Lys Arg Val Leu Thr  
1 5 10 15

Gly Glu Leu Glu  
20

5

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> péptido

15

<400> 10

Val Tyr Pro His Ile Val Lys Asn Asn Pro Gly Asp Tyr Leu Leu Lys  
1 5 10 15

Asn Gly Glu Asp  
20

20

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

<400> 11

25

Ser Gln Ile Asp Asn Lys Lys Ile Lys Asn Leu Asp Asp Tyr Val Gly  
1 5 10 15

Lys Val Cys Glu  
20

30

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido

35

<400> 12

Thr Trp Lys Arg Ile Arg His Pro Ser Glu Met Val Glu Leu Asn Gln  
1 5 10 15

Glu Leu Glu Val  
20

40

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

45

<220>

<223> péptido

<400> 13

**Gln Lys Glu His Asn Pro Trp Glu Asp Ile Glu Lys Lys Tyr Pro Pro**  
**1 5 10 15**

**Gly Lys Arg Val**  
**20**

5

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> péptido

15 <400> 14

**Phe Leu val His Gly Gly Asp Ala Gly His Asp Ala Glu Glu Glu ser**  
**1 5 10 15**

**Ser Asp Arg Asp**  
**20**

20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> péptido

<400> 15

**Met Thr Lys His Gly Lys Arg Ile Arg Gly Ile Gln Glu Thr Tyr Asp**  
**1 5 10 15**

**Leu Ala Lys Ser**  
**20**

30

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

35

<220>

<223> péptido

<400> 16

**Ile Asp Pro Arg Lys Ser Asp Gln Gln Ile Arg Gly Ser Val Ser Leu**  
**1 5 10 15**

40

**Pro His Gly Thr**  
**20**

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

45 <213> artificial

<220>  
<223> péptido

<400> 17

5

**Pro Thr Pro Lys Ala Gly Thr Val Thr Thr Asp Val Val Lys Thr Val**  
**1 5 10 15**

**Ala Glu Leu Arg**  
**20**

<210> 18  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> artificial

10

<220>  
<223> péptido

15

<400> 18

**Glu Met Met His Lys Leu Gln Asp Val Ile Asp Arg Lys Leu Leu Asp**  
**1 5 10 15**

**Ser Arg Arg Ile**  
**20**

<210> 19  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> artificial

20

<220>  
<223> péptido

25

<400> 19

**Ala Val Pro Gly Arg Arg Phe Ala Thr Pro His Ala Arg Ile Met Ile**  
**1 5 10 15**

**His Gln Pro Ser**  
**20**

30

<210> 20  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> artificial

35

<220>  
<223> péptido

40

<400> 20

**Glu Ala Thr Gly Gln Ser Arg Glu Val Ile Glu Lys Ala Ile Asp Arg**  
**1 5 10 15**

**Asp Met Trp Met**  
**20**

<210> 21  
<211> 20

45



<212> PRT  
<213> artificial

5 <220>  
<223> péptido

<400> 21

**Thr Ser Pro Asp Thr Ser Glu Ser Ser Glu Thr Ser Ser Thr Ser Ser**  
**1 5 10 15**

**Ser Asp His Ile**  
**20**

10 <210> 22  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> artificial

15 <220>  
<223> péptido

<400> 22

20 **Ser Ile Gly Gly Ser Arg Thr Ser Gly Pro Glu Asn Thr Ser Asp Gly**  
**1 5 10 15**

**Ala Ala Ala Ala**  
**20**

25 <210> 23  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> artificial

30 <220>  
<223> péptido

<400> 23

**Ser Gln Glu Ala Ser Ser Gly Tyr Thr Pro Ser Ala Trp Arg Arg Gly**  
**1 5 10 15**

**His Arg Val Asp**  
**20**

35 <210> 24  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> artificial

40 <220>  
<223> péptido

<400> 24

**Ile Asn Thr Asn Asn Gln Thr Asp Asp Ile Asn Thr Thr Asp Lys Asp**  
**1 5 10 15**

**Ser Asp Gly Ala**  
**20**

5 <210> 25  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> péptido  
 <400> 25

**Thr Glu Ser Ser Ser Gly Asp Asp Ser Gly Ser Val Ser Ser Ser Glu**  
**1 5 10 15**

**Ser Asp Lys Asn**  
**20**

15 <210> 26  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> péptido  
 <400> 26

**Ser Ser Gly Asp Glu Ser Gly Gly Val Ser Ser Pro Ser Ser Glu Ser**  
**1 5 10 15**

**Asn Lys Asn Thr**  
**20**

25 <210> 27  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30 <220>  
 <223> péptido

35 <400> 27

**Gly Arg Gln Ala Pro Asp Phe Ser Gly Lys Ala Val Val Cys Gly Glu**  
**1 5 10 15**

**Glu Lys Glu Ile**  
**20**

40 <210> 28  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> artificial

45 <220>  
 <223> péptido

<400> 28

Ala Arg Asn Ala Gly Gly Ile Glu Gly Thr Glu Tyr Pro Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Asp Pro Ser Phe  
20

5 <210> 29  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> artificial

10 <220>  
<223> péptido

<400> 29

Asn Trp Arg Ser Gly Glu Arg Gly Met Val Pro Ser Glu Glu Gly Leu  
1 5 10 15

Lys Glu Tyr Phe  
20

15

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la comprobación selectiva de infecciones por *Chlamydia trachomatis* y para la averiguación de si se trata de una infección aguda por *Chlamydia pneumoniae* o de una infección crónica por *Chlamydia trachomatis* o de una infección aguda por *Chlamydia trachomatis*, **caracterizado por que** se usan al menos tres antígenos para la comprobación de anticuerpos en muestras, estando seleccionados los antígenos del grupo compuesto por: CT017, CT098, CT318-L1P, CT431, CT456-TARP, CT603-TSAP y CT664 así como de fragmentos y subsecuencias de los anteriores antígenos, presentando los fragmentos al menos 15 aminoácidos consecutivos de los antígenos y al menos un epítipo específico de especie diagnósticamente relevante.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** se usan al menos cuatro antígenos para el procedimiento.
- 15 3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el procedimiento para la detección de los anticuerpos comprende la comprobación de un complejo de antígeno/anticuerpo.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el procedimiento para la detección de los anticuerpos se realiza mediante un procedimiento de ensayo de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), transferencias de Western o Ensayos de Línea.
- 25 5. Procedimiento para el análisis del curso de la enfermedad *in vitro* de una infección por *Chlamydia trachomatis*, **caracterizado por que** en determinados intervalos de tiempo se toman muestras de un paciente y las muestras se examinan según el procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores.
- 30 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** las muestras a examinar se someten a una lisis celular antes de ponerse en contacto con los antígenos.
- 35 7. Kit de ensayo para la comprobación selectiva de infecciones por *Chlamydia trachomatis*, **caracterizado por que** el kit de ensayo contiene al menos tres antígenos seleccionados del grupo compuesto por: CT017, CT098, CT318-L1P, CT431, CT456-TARP, CT603-TSAP y CT664.
- 40 8. Biochip, **caracterizado por que** presenta al menos tres antígenos seleccionados del grupo compuesto por: CT017, CT098, CT318-L1P, CT431, CT456-TARP, CT603-TSAP y CT664 para la comprobación de anticuerpos específicos de *Chlamydia trachomatis*.
- 45 9. Biochip de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado por que** los antígenos específicos de *Chlamydia trachomatis* están aplicados sobre un punto de la membrana del biochip que está separado espacialmente de otros puntos sobre la membrana, sobre los cuales están aplicados otros antígenos.
10. Biochip de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, **caracterizado por que**, separados espacialmente de los antígenos específicos de *Chlamydia trachomatis*, están aplicados otros antígenos sobre la membrana que posibilitan una comprobación específica de *Chlamydia pneumoniae* o *Chlamydia psittaci*.
11. Uso de un antígeno para el diagnóstico diferencial de una infección por clamidias, concretamente para la averiguación de si se trata de una infección aguda por *Chlamydia pneumoniae*, una infección crónica por *Chlamydia trachomatis* o una infección aguda por *Chlamydia trachomatis*, **caracterizado por que** el antígeno se selecciona de CT456-TARP así como subsecuencias de este antígeno que presentan al menos 20 aminoácidos consecutivos de la secuencia con la SEC ID N°: 5 y al menos un epítipo específico de especie diagnósticamente relevante.