

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-534526  
(P2004-534526A)

(43) 公表日 平成16年11月18日(2004.11.18)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/118	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/118	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 271 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2002-579810 (P2002-579810)  
 (86) (22) 出願日 平成14年4月9日 (2002.4.9)  
 (85) 翻訳文提出日 平成15年10月8日 (2003.10.8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/DK2002/000234  
 (87) 国際公開番号 W02002/082091  
 (87) 国際公開日 平成14年10月17日 (2002.10.17)  
 (31) 優先権主張番号 PA 2001 00581  
 (32) 優先日 平成13年4月9日 (2001.4.9)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)  
 (31) 優先権主張番号 60/282, 513  
 (32) 優先日 平成13年4月9日 (2001.4.9)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

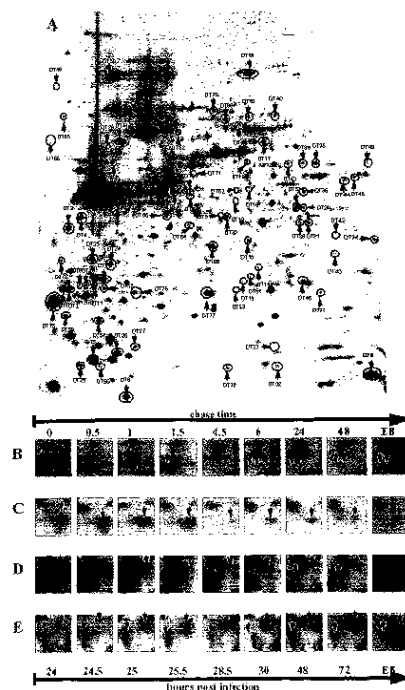
(71) 出願人 503369336  
 ショー、アラン、クリスチアン  
 デンマーク国、アールフス シー、グロニ  
 ンゲン 3. 3. ティエイチ  
 (71) 出願人 503369347  
 バンダール、ブライアン、ベルグ  
 デンマーク国、アールフス エヌ、スコバ  
 ングスベユ 154、エスティ、ティブイ  
 (74) 代理人 100066692  
 弁理士 浅村 皓  
 (74) 代理人 100072040  
 弁理士 浅村 肇  
 (74) 代理人 100088926  
 弁理士 長沼 暉夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞内細菌からのタンパク質を同定する方法

(57) 【要約】

本発明は、分泌経路に関係なく細胞内細菌から分泌されるタンパク質の同定を可能にする、新規な組合せ法に関する。さらに本発明は、これらの方法によって同定されるタンパク質を提供する。分泌タンパク質は、免疫原性組成物中に含ませること、かつ/あるいは診断目的に適した候補であることが知られている。本発明は、同定した分泌タンパク質からのペプチドエピトープ (T細胞エピトープ)、及びこれらのタンパク質をコードする核酸化合物も提供する。さらに本発明は、薬剤及び診断用途などの、タンパク質又はその断片のさまざまな用途を含む。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

細胞内細菌から分泌されるタンパク質を同定するための方法であって、

- 1) 細胞内細菌によって宿主細胞を感染させるステップと、
- 2) 感染細胞中に存在する細胞内細菌を標識するステップと、
- 3) a) 感染細胞の全細胞溶解物、及び  
b) 感染細胞から得られる精製・溶解細菌  
を調製するステップと、
- 4) i) ステップ3 a) で得た全細胞溶解物と、 ii) ステップ3 b) で得た精製・溶解細菌との、二次元ゲル電気泳動によるタンパク質プロファイルと比較するステップと、
- 5) 全細胞溶解物中に存在するが、該精製細菌中には存在しないか、若しくは有意に低下した量で存在する、ステップ4) で得たタンパク質スポットを検出するステップと、
- 6) ステップ5) で選択したスポット中のタンパク質を同定するステップ  
とを含む、上記方法。

10

## 【請求項2】

細胞内細菌から分泌されるタンパク質を同定するための方法であって、

- 1) 細胞内細菌によって宿主細胞を感染させるステップと、
- 2) 感染細胞中に存在する細胞内細菌をパルス標識するステップと、
- 3) ステップ2) 後の異なる追跡時間後に、感染細胞の全細胞溶解物を調製するステップと、
- 4) ステップ3) で得た異なる追跡時間後に調製した全細胞溶解物の、二次元ゲル電気泳動によるタンパク質プロファイルと比較するステップと、
- 5) ステップ3) で追跡時間が増大するにつれ存在量が減少する、ステップ4) で得たタンパク質スポットを検出するステップと、
- 6) ステップ5) で選択したスポット中のタンパク質を同定するステップ  
とを含む方法。

20

## 【請求項3】

細胞内細菌から分泌されるタンパク質を同定するための方法であって、

- 1) 細胞内細菌によって宿主細胞を感染させるステップと、
- 2) それぞれプロテアソーム阻害剤の存在下及び不在下で、宿主細胞を培養するステップと、
- 3) それぞれプロテアソーム阻害剤の存在下及び不在下で培養した感染細胞中に存在する細胞内細菌を、標識するステップと、
- 4) 感染細胞の全細胞溶解物を調製するステップと、
- 5) それぞれプロテアソーム阻害剤の存在下及び不在下で培養した感染細胞の、全細胞溶解物の二次元ゲル電気泳動によるタンパク質プロファイルと比較するステップと、
- 6) プロテアソーム阻害剤の存在下で培養した全細胞溶解物中には存在するが、プロテアソーム阻害剤の不在下で培養した全細胞溶解物中には存在しないか、あるいは有意に低下した量で存在する、ステップ5) で得たタンパク質スポットを検出するステップと、
- 7) ステップ6) で選択したスポット中のタンパク質を同定するステップ  
とを含む方法。

30

40

## 【請求項4】

- 1) 請求項1から請求項3までのいずれかに従って同定した前記細胞内細菌からのタンパク質に対する抗体を得るステップと、
- 2) ステップ1) で得た抗体を使用して、前記細菌を感染させた細胞の全細胞溶解物に二次元PAGE免疫プロット法を適用するステップと、
- 3) ステップ2) において反応するタンパク質スポットを検出するステップと、
- 4) ステップ3) で選択したスポット中のタンパク質を同定するステップと  
をさらに含む、請求項1から請求項3までのいずれかに記載の方法。

## 【請求項5】

50

請求項 1 から請求項 4 までに記載の方法の組合せを含む、細胞内細菌から分泌されるタンパク質を同定するための方法。

【請求項 6】

前記標識が、[ 3 5 S ] シス테인、[ 3 5 S ] メチオニン、[ 1 4 C ] 標識アミノ酸、又はこれらの組合せからなる放射性手段によるものである、請求項 1 から請求項 5 までのいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

タンパク質を同定するための請求項 1 から請求項 6 までのいずれかに記載の方法であって、前記タンパク質がその完全長で、又はその免疫原性断片として、免疫原性組成物中に含まれることに、及び / 又は診断目的に適している方法。

10

【請求項 8】

同定法が、エドマン分解法、又は MALDI TOF MS (マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化法飛行時間質量分析法)、ESI Q - TOF MS (エレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間質量分析法)、PSD - MALDI MS (ポストソース分解 MALDI 質量分析法) などの任意の質量分析法、又はこのような方法の組合せに基づくものである、請求項 1 から請求項 7 までのいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

同定する前にタンパク質に、臭化シアン処理又はヒドロキシルアミン処理などの化学的方法、或いはトリプシン、スリモトリプシン、キモトリプシン、又はペプシンなどの任意の適切な酵素を用いる酵素的な方法、或いはこれらの組合せによって切断を施す、請求項 1 から請求項 8 までのいずれかに記載の方法。

20

【請求項 10】

細胞内細菌が通性細胞内細菌又は偏性細胞内細菌である、請求項 1 から請求項 9 までのいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

細菌が *C. pneumoniae*、*C. trachomatis*、*C. psittaci* 又は *C. pecorum* など、これらの任意の特定の亜型又は菌株を含むクラミジア属からの細菌である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

細胞内細菌が *Chlamydia trachomatis* である、請求項 11 に記載の方法。

30

【請求項 13】

細胞内細菌が *Chlamydia pneumoniae* である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

宿主細胞が、HeLa、Hep 2、McCoy 又は U937 などの不死化細胞系、哺乳動物ドナーから得たかあるいは剖検によって得た初代細胞系、遺伝的に改変された細胞系、又は器官細胞の培養物である、請求項 1 から請求項 13 までのいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

宿主細胞が、プロテアソームのサブユニットをコードする遺伝子、又は MHC クラス I の提示に関与する機能的に重要なタンパク質をコードする他の遺伝子などの、クラミジアワクチンの開発に適していると認められる遺伝子を過剰に発現するか、又は抑制するように、遺伝的に改変された、請求項 14 に記載の方法。

40

【請求項 16】

宿主細胞を、細胞内細菌による感染の前又は最中に IFN - で処理する、請求項 1 から請求項 15 までのいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

MG132、MG262、MG115、エポキシマイシン、PSI 及びクラスト - ラクタシスチン - - ラクトンなどのプロテアソーム阻害剤、又はこれらの組合せを使用する、請求項 2 又は請求項 4 から請求項 16 までのいずれかに記載の方法。

50

## 【請求項 18】

請求項 1 から請求項 17 までのいずれかに記載の方法によって同定可能なタンパク質、又はその免疫原性断片。

## 【請求項 19】

免疫原性組成物中に含めることに、及び/又は診断目的に適用可能である、請求項 18 に記載のタンパク質、又はその免疫原性断片。

## 【請求項 20】

免疫原性組成物中に含めることに適した、MHCクラス I 又は II 拘束性抗原として提示するための候補である T 細胞エピトープを含む、請求項 19 に記載のタンパク質。

## 【請求項 21】

免疫原性組成物中に含めることに適した、MHCクラス I 制限抗原として提示するための候補である T 細胞エピトープを含む、請求項 20 に記載のタンパク質。

10

## 【請求項 22】

+ / - 10% の平均誤差で決定される、表 I に示したタンパク質 DT1 ~ DT77 の 1 つの等電点 (pI) 及び分子量 (Mw) 特性を有する、請求項 18 から請求項 21 までのいずれかに記載の *Chlamydia trachomatis* のタンパク質、又はその免疫原性断片。

## 【請求項 23】

表 I I I A に示した、CT017 (遺伝子名 CT017)、CT044 (遺伝子名 s s p)、CT243 (遺伝子名 l p x D)、CT263 (遺伝子名 CT263)、CT265 (遺伝子名 a c c A)、CT286 (遺伝子名 c l p C)、CT292 (遺伝子名 d u t)、CT407 (遺伝子名 d k s A)、CT446 (遺伝子名 e u o)、CT460 (遺伝子名 S W I B)、CT541 (遺伝子名 m i p)、CT610 (遺伝子名 CT610)、CT650 (遺伝子名 r e c A)、CT655 (遺伝子名 k d s A)、CT668 (遺伝子名 CT668)、CT691 (遺伝子名 CT691)、CT734 (遺伝子名 CT734)、CT783 (遺伝子名 CT783)、CT858 (遺伝子名 CT858)、CT875 (遺伝子名 CT875)、又は ORF5 (遺伝子名 ORF5) として対応する遺伝子番号によって、あるいは遺伝子名 DT8 によって同定される、請求項 18 から請求項 21 までのいずれかに記載の *Chlamydia trachomatis* のタンパク質、又はその免疫原性断片。

20

30

## 【請求項 24】

+ / - 10% の平均誤差で決定される、表 I V に示したタンパク質 DT1、DT2、DT3、DT5、DT9、DT10、DT11、DT13、DT14、DT17、DT47、DT59、DT60、DT61 又は DT62 の 1 つの等電点 (pI) 及び分子量 (Mw) 特性を有する、請求項 18 から請求項 21 までのいずれかに記載の *Chlamydia trachomatis* のタンパク質、又はその免疫原性断片。

## 【請求項 25】

タンパク質 DT4 (遺伝子名 CT858)、DT23 (遺伝子名 m i p)、DT47、DT48 (遺伝子名 CT858)、DT75、DT76 (遺伝子名 CT691)、及び DT77 (遺伝子名 CT263) から選択される、請求項 22 に記載の *Chlamydia trachomatis* のタンパク質、又はその免疫原性断片。

40

## 【請求項 26】

+ / - 10% の平均誤差で決定される、表 I I に示したタンパク質 CP1 ~ CP91 の 1 つの等電点 (pI) 及び分子量 (Mw) 特性を有する、請求項 18 から請求項 21 までのいずれかに記載の *Chlamydia pneumoniae* のタンパク質、又はその免疫原性断片。

## 【請求項 27】

表 I I I B に示した、CPN0152 (遺伝子名 CPN0152)、CPN0702、CPN0705 (遺伝子名 CPN0705)、CPN0711 (遺伝子名 CPN0711)、CPN0796 (遺伝子名 CPN0796)、CPN0998 (遺伝子名 f t s H)、

50

CPN0104 (遺伝子名CPN0104)、CPN0495 (遺伝子名aspC)、CPN0684 (遺伝子名parB)、CPN0414 (遺伝子名accA)、CPN1016 (遺伝子名CPN1016)、CPN1040 (遺伝子名CPN1040)、CPN0079 (遺伝子名rl10)、CPN0534 (遺伝子名dksA)、CPN0619 (遺伝子名ndk)、CPN0711 (遺伝子名CPN0711)、CPN0628 (遺伝子名rs13)、CPN0926 (遺伝子名CPN0926)、CPN1016 (遺伝子名CPN1016)、CPN1063 (遺伝子名tpiS)、又はCPN302 (遺伝子名lpxD)として対応する遺伝子番号によって同定される、請求項18から請求項21までのいずれかに記載のChlamydia pneumoniaeのタンパク質、又はその免疫原性断片。

10

## 【請求項28】

タンパク質CP34 (遺伝子名CPN1016)、CP37 (遺伝子名CPN0998)、CP46 (遺伝子名CPN0796)、CP47 (遺伝子名CPN0705)、CP52 (遺伝子名CPN0152)、CP63 (遺伝子名CPN1016)、及びCP75 (遺伝子名ndk)から選択される、請求項26に記載のChlamydia pneumoniaeのタンパク質、又はその免疫原性断片。

## 【請求項29】

DT8であり、以下の配列(配列番号1)：

MQHTIMLSLENDNDKLASMMDRVVAASSSILSASKDSESN  
RQFTISKAPDKEAPCRVSYVAASALSE

20

を含むことを特徴とする、Chlamydia trachomatisのポリペプチド、又はその免疫原性断片。

## 【請求項30】

請求項18から請求項29までのいずれかに記載のタンパク質と、少なくとも40%の配列同一性、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、さらに好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するタンパク質、又はその免疫原性断片。

## 【請求項31】

請求項18から請求項30までのいずれかに記載のタンパク質の少なくとも7個の連続したアミノ酸を含む、タンパク質又はその免疫原性断片。

30

## 【請求項32】

配列番号3～配列番号45の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項31に記載のChlamydia trachomatisのタンパク質、又はその免疫原性断片。

## 【請求項33】

配列番号122～配列番号148の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項32に記載のChlamydia trachomatisタンパク質のChlamydia pneumoniaeの相同体、又はその免疫原性断片。

## 【請求項34】

配列番号46～配列番号121の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項31に記載のChlamydia pneumoniaeタンパク質、又はその免疫原性断片。

40

## 【請求項35】

配列番号149～配列番号194の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項34に記載のChlamydia pneumoniaeタンパク質のChlamydia trachomatis相同体、又はその免疫原性断片。

## 【請求項36】

請求項18から請求項35までのいずれかに記載のタンパク質、又はその免疫原性断片をコードする配列を含む核酸化合物。

## 【請求項37】

請求項29に記載のポリペプチドをコードする配列を含む核酸化合物。

## 【請求項38】

50

ATGCAACACACAATTATGCTGTCTTTAGAGAACGATAATGATAAGCTTGCTTCTATGATG  
 GATCGAGTTGTTGCTGCGTCATCAAGCATTCTTTCTGCTTCCAAAGATTCTGAGTCCAAT  
 AGACAGTTTACTATTTCTAAAGCTCCGGATAAAGAAGCTCCTTGACAGAGTATCTTATGTA  
 GCTGCAAGTGCACTTTCAGAAATAG

又はその断片あるいは縮重配列を含む、請求項 3 7 に記載の核酸化合物。

【請求項 3 9】

請求項 3 6 から請求項 3 8 までのいずれかに記載の核酸化合物を含むベクター。

【請求項 4 0】

請求項 3 9 に記載のベクターで、形質転換又はトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項 4 1】

請求項 1 8 から請求項 3 5 までのいずれかに記載のタンパク質、又はその免疫原性断片に対する抗体を産生させるための、前記タンパク質又はその断片の使用。

【請求項 4 2】

細胞内細菌に対する抗体を産生させるための方法であって、請求項 1 8 から請求項 3 5 までのいずれかに記載のタンパク質、又はその免疫原性断片を産生動物に投与し、かつ抗体をそこから精製する方法。

【請求項 4 3】

請求項 4 2 に記載の方法によって得ることができる抗体。

【請求項 4 4】

請求項 1 8 から請求項 3 5 までのいずれかに記載のタンパク質又はその断片、請求項 4 3 に記載の抗体、又は請求項 3 6 から請求項 3 8 までのいずれかに記載の核酸化合物を含む、薬剤組成物又は診断組成物。

【請求項 4 5】

診断試薬の調製における、請求項 1 8 から請求項 3 5 までのいずれかに記載のタンパク質又はその断片、請求項 4 3 に記載の抗体、又は請求項 3 6 から請求項 3 8 までのいずれかに記載の核酸化合物の使用。

【請求項 4 6】

細胞内細菌からの分泌タンパク質上の T 細胞エピトープを同定するための方法であって、請求項 1 から請求項 1 7 までのいずれかに記載の方法において同定したタンパク質又はその免疫原性断片に関する、コンピュータによる予測、MHC クラス分子の結合アッセイ及び/又は ELISPOT アッセイなどのステップを含む方法。

【請求項 4 7】

表面に存在している可能性があり、請求項 4 6 に記載の方法によって得ることができる、ペプチドエピトープ。

【請求項 4 8】

請求項 1 8 から請求項 3 1 までのいずれかに記載のタンパク質の 4 ~ 25 個の連続したアミノ酸、好ましくは 6 ~ 15 個のアミノ酸、最も好ましくは 7 ~ 10 個のアミノ酸を含む、ペプチドエピトープ。

【請求項 4 9】

*Chlamydia trachomatis* 又は *Chlamydia p* の 7 ~ 10 個の連続したアミノ酸を含む、ペプチドエピトープ。

【請求項 5 0】

配列番号 1 の配列を含むポリペプチドの 4 ~ 25 個の連続したアミノ酸、好ましくは 6 ~ 15 個のアミノ酸、最も好ましくは 7 ~ 10 個のアミノ酸を含む、ペプチドエピトープ。

【請求項 5 1】

配列番号 3 ~ 配列番号 4 5 の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 7 に記載の *Chlamydia trachomatis* のペプチドエピトープ。

【請求項 5 2】

10

20

30

40

50

配列番号122～配列番号148の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項51に記載のChlamydia trachomatisのペプチドエピトープ中の、Chlamydia pneumoniaeのペプチドエピトープ。

【請求項53】

配列番号46～配列番号121の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項47に記載のChlamydia pneumoniaeのペプチドエピトープ。

【請求項54】

配列番号149～配列番号194の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項53に記載のChlamydia pneumoniaeのペプチドエピトープ中の、Chlamydia trachomatisのペプチドエピトープ。

10

【請求項55】

融合タンパク質の一部であることを特徴とする、請求項47から請求項54までのいずれかに記載のペプチドエピトープ。

【請求項56】

担体成分に結合していることを特徴とする、請求項47から請求項54までのいずれかに記載のペプチドエピトープ。

【請求項57】

請求項47から請求項56までのいずれかに記載のペプチドエピトープをコードする配列を含むことを特徴とする、核酸化合物。

【請求項58】

請求項57に記載の核酸化合物を含むベクター。

20

【請求項59】

請求項58に記載のベクターで、形質転換又はトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項60】

免疫原性組成物を調製するための、請求項47から請求項56までのいずれかに記載のペプチドエピトープの使用。

【請求項61】

薬剤として許容される賦形剤を場合によっては含む、請求項47から請求項56までのいずれかに記載のペプチドエピトープを含む免疫原性組成物。

【請求項62】

細胞内細菌による感染を治療又は予防するための薬剤組成物の調製における、請求項18から請求項35までのいずれかに記載のタンパク質、請求項43に記載の抗体、請求項36から請求項38までのいずれか又は請求項57に記載の核酸化合物、又は請求項47から請求項56までのいずれかに記載のペプチドエピトープの使用。

30

【請求項63】

クラミジアによる感染を治療又は予防するための薬剤組成物の調製における、請求項22から請求項35までのいずれかに記載のタンパク質、請求項43に記載の抗体、請求項36から請求項38までのいずれか又は請求項57に記載の核酸化合物、又は請求項47から請求項56までのいずれかに記載のペプチドエピトープの使用。

【請求項64】

細胞内細菌又は細胞内細菌に対して産生された抗体の存在を検出するための診断試薬の調製における、請求項18から請求項35までのいずれかに記載のタンパク質、請求項43に記載の抗体、請求項36から請求項38までのいずれか又は請求項57に記載の核酸化合物、又は請求項47から請求項56までのいずれかに記載のペプチドエピトープの使用。

40

【請求項65】

クラミジア又はクラミジアに対して産生された抗体の存在を検出するための診断試薬の調製における、請求項22から請求項35までのいずれかに記載のタンパク質、請求項43に記載の抗体、請求項36から請求項38までのいずれか又は請求項57に記載の核酸化合物、又は請求項47から請求項56までのいずれかに記載のペプチドエピトープの使用

50

。

## 【請求項 66】

ヒトの免疫応答を誘導する方法であって、免疫学的に有効な量の請求項 18 から請求項 35 までのいずれかに記載のタンパク質、請求項 43 に記載の抗体、請求項 36 から請求項 38 までのいずれか又は請求項 57 に記載の核酸化合物、又は請求項 47 から請求項 56 までのいずれかに記載のペプチドエピトープを前記ヒトに投与することを含む方法。

## 【請求項 67】

細胞内細菌によるヒト又は動物の感染を治療又は予防するための、請求項 66 に記載の方法。

## 【請求項 68】

細胞内細菌がクラミジア属からのものである、請求項 66 から請求項 67 までのいずれかに記載の方法。

10

## 【請求項 69】

細胞内細菌が *C. trachomatis* である、請求項 68 に記載の方法。

## 【請求項 70】

細胞内細菌が *C. pneumoniae* である、請求項 68 に記載の方法。

## 【請求項 71】

請求項 18 から請求項 35 までのいずれかに記載のタンパク質又はその断片を生成する方法であって、請求項 39 に記載のベクターを用いて宿主細胞を形質転換、トランスフェクト、又は感染させること、及び宿主細胞による前記タンパク質又は断片の発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養することを含む方法。

20

## 【請求項 72】

請求項 47 から請求項 54 までのいずれかに記載のペプチドエピトープを生成する方法であって、請求項 58 に記載のベクターを用いて宿主細胞を形質転換、トランスフェクト、又は感染させること、及び宿主細胞による前記ペプチドエピトープの発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養することを含む方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、分泌経路に関係なく細胞内細菌から分泌されるタンパク質の同定を可能にする、方法の新規な組合せに関する。さらに本発明は、これらの方法によって同定されるタンパク質を提供する。分泌されるタンパク質は、免疫原組成物及び/又は診断対象に適した候補物質であることが知られている。本発明は、同定した分泌タンパク質から得たペプチドエピトープ (T 細胞エピトープ)、並びにこれらのタンパク質をコードする核酸化合物も提供する。さらに本発明は、薬薬や診断への応用といった、タンパク質又はその断片のさまざまな応用を含む。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

クラミジアは、真核生物の宿主細胞内で増殖する偏性細胞内細菌であり、重要なヒト病原体である。クラミジア目は、1つの科 (クラミジア科) を含み、この科は1つの属 (クラミジア属) を含み、この属は4つの種: *C. trachomatis* (トラコーマクラミジア)、*C. pneumoniae* (肺炎クラミジア)、*C. psittaci* (オウム病クラミジア) 及び *C. pecorum* に分けられる。

40

## 【0003】

*C. trachomatis* のヒト病原性による亜型は、眼性疾患を起こす A ~ C、及び性的接触で伝播され、尿道炎、或いは卵管炎、精巣上体炎及び子宮外妊娠などを伴う合併症を引き起こす D ~ K、及び重度の全身感染、性病性リンパ肉芽腫症 (LGV) を引き起こす L1 ~ L3 に分けられる。ヒト病原体 *C. pneumoniae* は、気管支炎及び肺炎を引き起こす呼吸管感染の原因であり、最近、アテローム性動脈硬化の進行との関連付けがなされてきている (Saikku 他、1988 [1.]、Shor 他、1992 [2

50

. ] ) 。

【 0 0 0 4 】

未治療のままである場合、クラミジア感染は、生殖不能、失明及びおそらく血栓症などの重度の合併症を伴って慢性的なものとなる可能性がある。

【 0 0 0 5 】

細胞内での発生サイクルによって、持続的なクラミジア感染が異常な免疫応答を引き起こし、その細菌を明らかにできない場合がある。多くの免疫原性のクラミジアタンパク質、特に *C. trachomatis* の主要抗原である主要外膜タンパク質 (MOMP) [ 7 . ] などの表面露出タンパク質だけでなく、Hsp60などのストレス応答タンパク質 [ 8 . ] は、ワクチン候補であると考えられている。しかしながら、これらの候補はいずれも、ワクチン試験において有効であることは証明されていない。 10

【 0 0 0 6 】

体液性応答が限られていること、及び防御免疫がほとんどないことを適当に説明できるのは、細菌の細胞内の性質である。したがって、1つの選択的な手法は、細胞媒介性の免疫系によって認識可能なタンパク質を発見することであり、主に細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) の影響によるクラミジア感染の解明において、この手法が要となることが示されてきている (Iguitseme 他、1994 [ 9 . ] ) 。

【 0 0 0 7 】

多大な注目が分泌タンパク質に集まってきている。なぜならこれらを、宿主細胞のプロテアソームでプロセッシングし、細胞の表面上でMHCクラスI抗原として提示することができ、したがって明らかなワクチン標的となるからである (Hess and Kaufmann、1993 [ 45 ] ) 。この一例はエルシニア感染細胞に関して示されており、この細胞は、YopHエフェクターのエピトープを、MHC拘束性細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) に対して提示する (Starnbach and Bevan、1995 [ 14 . ] ) 。クラミジアと宿主細胞の間の相互作用は、細菌の細胞内での生存及び増殖に関して必要不可欠である。 20

【 0 0 0 8 】

*C. trachomatis* の亜型D (Stephens 他、1998 [ 4 . ] ) ( 8 9 4 個の予想されるオープンリーディングフレーム (ORF) を含む ) 、及び *C. pneumoniae* VR1310 ( 1 0 7 3 個のORFを含む ) (Kalman 他、1999 [ 5 . ] ) に関して、完全かつ検索可能であるクラミジアのゲノムが存在する。さらに、*C. trachomatis* MoPn (Read 他、2000 [ 12 . ] ) 、*C. pneumoniae* AR39 (Read 他、[ 12 . ] ) 及び *C. pneumoniae* J138 (Shirai 他、2000 [ 13 . ] ) の、完全なゲノムが公に入手可能である。ゲノム配列から、クラミジアは、他の細菌のIII型分泌遺伝子と相同性があるいくつかの遺伝子を含む、分泌機構に関与する遺伝子を有することが知られている (Stephens 他、1998 [ 4 . ] ) 及び Kalman 他、1999 [ 5 . ] ) 。 30

【 0 0 0 9 】

分泌エフェクタータンパク質の候補は、III型分泌亜群中に存在する可能性がある (Subtil 他、2000 [ 10 . ] ) 。この見解は、CopNのIII型分泌特性の発見によって最近示された (Fields and Hackstadt、2000) [ 11 . ] 。しかしながら、III型分泌タンパク質は、認識可能なシグナルペプチダーゼ開裂部位を欠いており、クラミジア中のこの系によって分泌されるタンパク質のコンセンサス配列は未だ認識されていない。従って、このようなことは、問題となっている特定の細菌に限られる可能性がある。さらに分泌タンパク質は、ゲノム中の予測不能な位置にある機能的に多様な群のタンパク質である可能性がある (Subtil 他、2000 [ 10 . ] ) 。 40

【 0 0 1 0 】

分泌されるクラミジアのエフェクタータンパク質に関する現状の知識は、Incファミリー (Rockey 他、1995) [ 15 . ] [ 16 . ] 、CopN (Fields an 50

d Hackstadt, 2000) [11.] )及びCT529 (Flinig他、2001) [37.]のメンバーを含む、封入体膜中に存在するタンパク質に限られる。

【0011】

クラミジアに特異的なCD8+T細胞が感染中に生じることが示されており、これは、MHCクラスI抗原を提示するために必須であるクラミジアのタンパク質が、宿主細胞の細胞質に曝されていることを意味する。CT529は、真核細胞内での発現、及びクラミジアに特異的なT細胞系による認識によってゲノムライブラリーから同定されてきている(Probst) [41]。CT529は、マウスワクチンの実験において、感染に対していくらかの防御をもたらすエピトープを有することが示されている。

【0012】

ウイルスベクターでトランスフェクションすることにより、Chlamydia trachomatis 亜型L2のゲノムライブラリーを真核細胞内で発現させ、次いで、クラミジアに特異的なT細胞でスクリーニングすることにより、MHCクラスI拘束性エピトープを含むタンパク質を検出することが、国際特許出願No. WO 00/34483に記載されている(Probst) [41]。

この方法によって5つの陽性クローンが同定されており、この中の1つにCT529が含まれている。他の一のクローンは3つのオープンリーディングフレームを含んでいたが、残りの3つのクローンについては、それ以上の記載はない。このようなスクリーニングの欠点は、真核細胞での細菌タンパク質の発現が、プロテアソームによるプロセッシングの確率とMHC抗原としての提示そのものを変えるという点で、細菌における発現と異なっていることにあり、T細胞クローンの維持及び刺激は*in vivo*での状況とは異なり、通常の感染中は接触不可能なタンパク質を認識するクローンによって、偽陽性となる場合がある。前述の特許出願中の他の手法は、体液性免疫防御を対象とするワクチンに関する候補の同定に関するものである。

【0013】

細胞内細菌から分泌されたタンパク質を検索するとき、直接的なアイデアとしては、感染した宿主細胞から細胞質を単離し、細菌タンパク質を探すことである。しかしながら、クラミジアの網状体の脆さのために、この戦略をクラミジアに関して使用することはできない。他の手法は、トランスポゾン分析によって、分泌タンパク質であることが多い病原性因子を同定することであると思われる。しかしながら、クラミジアをトランスフェクトすることはできない。どのタンパク質が分泌されたかを予想することができる戦略は存在しないし、ワクチン開発に適したエフェクタータンパク質をコードする遺伝子が、ゲノム中の予測不能な位置に存在することがある。

【0014】

したがって、コスト効率の良い方法でワクチン候補の数を制限することができ、最小限の実験ステップを含む信頼できるシステムが必要とされる。

【0015】

[18]では、2次元ゲル電気泳動によるオートラジオグラフィと組み合わせて、[35S]-メチオニン/システイン標識したC. trachomatisのタンパク質によって、C. trachomatis A及びL2のタンパク質発現に対するINF-の影響を調べた。C. trachomatis Aで培養物中のHeLa細胞を感染させている間に加えられたINF-によって、いくつかのC. trachomatis Aのタンパク質の顕著な下方制御がもたらされたが、一方でこの影響はC. trachomatis L2に関しては明白ではなかった。C. trachomatis A及びL2の両方で、~30及び~40kDaタンパク質が、INF-に依存して誘導されることが観察された。これらのタンパク質の誘導は、生理学的な量を超える量のL-トリプトファンを増殖培地に加えることによって弱められた。これによって、これらC. trachomatisタンパク質のINF-に媒介される誘導特性が、IFN-の媒介による、トリプトファンを分解する宿主細胞の酵素であるインドールアミン2,3ジオキシゲナーゼの上方制御と関連することが示された。INF-誘導性のC. trachomat

10

20

30

40

50

is タンパク質の1つは、C. trachomatis L2と比較して、有意に分子量 (Mw) の小さなC. trachomatis Aのタンパク質の位置に移動した。

【0016】

[19]では、前に記載された (Shaw他、1999) INF-誘導性C. trachomatis A及びL2のタンパク質を、さらに特徴付けした。MALDI-TOF質量分析を使用し、次にデータベース検索によって、調製二次元ゲルから、C. trachomatisのトリプトファンシターゼ (TrpA)及び (TrpB)サブユニットとして、そのタンパク質を同定した。タンパク質は、C. trachomatis D中のINF-によって誘導され、3つすべての亜型において、生理学的な量を超える量のL-トリプトファンを加えることによって、この誘導は妨げられた。C. trachomatis AのTrpAは、C. trachomatis D及びL2と比較して、C. trachomatis Aにおける分子量 (Mw) が小さな蛋白の位置で移動した。これら亜型におけるC. trachomatisのtrpA遺伝子の分析によって明らかのように、C. trachomatis A及びCのTrpAは、C. trachomatis D及びL2のTrpAと比較して、~7.7kDaに切り詰められている。トラコーマを引き起こす亜型 (C. trachomatis A、B及びC)において、トリプトファンシターゼが切り詰められたり、あるいは存在しないことによって、トリプトファン合成能力が阻害され、これらの亜型をさらにINF-媒介性のトリプトファン欠乏に対してより感受性にする可能性がある。これによって、ヒト亜型C. trachomatis間の病原において見られる相違を説明することができる。

【0017】

[43]では、細胞内細菌であるリステリアモノサイトゲネスの、先に記載した分泌タンパク質 (p60) の宿主細胞におけるプロテアソームによる分解が検討された。使用した一般的戦略は、2つのペプチドアルデヒド: N-アセチル-Leu-Leu-ノルロイシン (LLnL) 及び (ベンジロキシカルボニル)-Leu-Leu-フェニルアラニン (Z-LLF) の存在下又は不在下で、[35S]-メチオニン/システイン標識を使用する、パルス追跡アッセイに基づくものであり、これらのペプチドアルデヒドは、真核生物プロテアソームのタンパク質分解活性を阻害するものである。p60に対して産生させたポリクローナル抗体を使用して、プロテアソーム阻害剤処理及び未処理のL. モノサイトゲネス感染J774細胞の溶解物から、p60を免疫沈降させた。1次元SDS PAGEによって分離された、免疫沈降標識p60のオートラジオグラフの評価によって、プロテアソーム阻害剤はp60のプロテアソーム分解を阻害することができたことが示唆された。感染細胞当たりのp60-CTLエピトープの数は、LLnL及びZ-LLFを用いた処理によって減少した。これによって、p60のプロテアソーム分解の阻害とp60-CTLエピトープ生成の間の関連が示唆された。

【0018】

[44]では、防御免疫の背後の機構、及び細胞内の微細物に対する細胞の免疫応答の一般的特徴が、細胞内の微細物に対する実用的な組み換えワクチンの開発に焦点を当てて記載された。抗原送達系を開発するための戦略は、マイコバクテリウムボビスBCG及びサルモネラチフィaroAに重点を置いて論じられた。これらの非毒性である細胞内細菌を遺伝的に改変して、免疫認識によりワクチンの標的として寄与する抗原を送達することができる。筆者は、ワクチンの開発の標的として分泌タンパク質を使用する利点を指摘する。なぜなら、細菌が宿主細胞内で依然として複製している間に、これらのタンパク質が、プロセッシングされ、細胞媒介性の免疫系に対して提示されるからである。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

本発明は、新規な方法の組合せによる分泌タンパク質の同定を含むものである。記載した方法の組合せは、感染細胞中に存在する細菌タンパク質のプロテオーム全体から、細胞内細菌のタンパク質のプロテオームを引くことによって、セクレトーム (分泌タンパク質の

集合物)を構成させる。

【0020】

細菌のタンパク質は、真核生物のタンパク質合成に対する阻害剤の存在下でパルス標識し、次いで、2次元ゲル電気泳動を行ない、オートラジオグラフィを行なうことによって、選択的に可視化することができる。精製した細菌からのタンパク質プロファイルは、感染細胞の全溶解物のタンパク質プロファイルに匹敵し、異なるイメージに存在するタンパク質スポットであるセクレトームは、感染細胞の全溶解物を載せたゲルから、高度な質量分析法によって同定する。

【0021】

同定した分泌タンパク質は、優れたT細胞エピトープであることが予想されるペプチド配列を得るために、高度な人工神経回路網によってさらに分析する。 10

【0022】

さらに、その代謝回転が宿主細胞のプロテアソームの阻害剤によって遅くなる、タンパク質が選択される。なぜならこれらのタンパク質は、宿主細胞のプロテアソームに非常に分解されやすく、宿主細胞の表面上でMHCクラスI抗原として非常に提示されやすいからである。

【課題を解決するための手段】

【0023】

ワクチン候補タンパク質及びエピトープを同定するための他の戦略と比較すると、本発明は候補の数をより限定し、これは新規な方法の組合せによってのみ達成することができる。 20

【0024】

本発明は、以下の観察事項に基づくものである。

- ・細胞内細菌から宿主細胞に分泌されるタンパク質は、精製した細菌には存在しないが、感染細胞の溶解物全体中には存在する。
- ・精製した細菌、及び感染細胞の溶解物全体の2次元タンパク質プロファイルは、細菌タンパク質の特異的なパルス標識を使用して、2次元ゲル電気泳動により可視化することができる。
- ・精製した細菌の2次元タンパク質プロファイルを、宿主細胞中に存在する細菌タンパク質の2次元タンパク質プロファイルから差し引くことにより、質量分析法による分泌タンパク質の同定が可能になる。 30
- ・細胞内細菌から分泌されるタンパク質は、宿主細胞のプロテアソームによってプロセッシングされ、T細胞を活性化させることができるMHCクラスI抗原を生成させる可能性がある。
- ・分泌タンパク質は、真核生物プロテアソームの阻害剤の添加にตอบสนองして長期の代謝回転を示し、宿主細胞の表面に提示される可能性がある。このようなタンパク質の同定は、2次元タンパク質プロファイルを分析することによって可能である。
- ・MHCクラスI複合体に関して高い親和性を有するペプチドを認識するように調整した人工神経ネットワークによって、T細胞エピトープを予測することができる。

【0025】

以下の定義を、本発明に関して使用する。 40

【0026】

(定義)

セクレトーム

細胞内細菌から分泌される可能性が非常に高いタンパク質。

【0027】

(III型)分泌亜群

他の生物体からのIII型分泌遺伝子と有意に相同性がある遺伝子を有する、一群のクラミジア遺伝子。

分泌群の定義は、他の細菌(たとえば、サルモネラ、シゲラ、エルシニア)中でのIII 50

型の分泌と関連がある遺伝子との相同性が知られている任意の遺伝子と、4つの遺伝子まで異なる既知又は未知の機能を有するORF（オープンリーディングフレーム）の集合を意味する。

【0028】

#### プロテアソーム阻害剤

活性化した26S真核生物プロテアソームのタンパク質分解活性を、可逆的又は不可逆的に阻害することができる、化学合成された、あるいは天然に存在する化合物。

当業者は、プロテアソームのタンパク質分解活性は、いくつかの異なる活性（たとえば、大きな疎水性残基の後ろを切断するキモトリプシン様活性、塩基性残基の後ろを切断するトリプシン様活性、酸性残基の後ろを切断するポストグルタミルヒドロラーゼ活性、分岐鎖アミノ酸の後ろを優先的に切断するBrAAP、小さな中性アミノ酸のサブユニットの後ろを切断するSNAPP）を含むことを理解するであろう。プロテアソームを阻害することが知られているいくつかの化合物は市販されており、殆どが細胞透過性ペプチド系の阻害剤（たとえば、ペプチドアルデヒド、ペプチドビニル（vinol）スルホン）である。ペプチド系の阻害剤は、遷移状態の類似体として機能して、プロテアソームの活性部位と付加体を形成し、その一方、天然に存在するクラスト-ラクタシスチン-ラクトンは、プロテアソームサブユニットの活性部位の不可逆的な改変によって、プロテアソーム阻害効果を発揮する。これらの化合物及びその組合せを使用すれば、プロテアソーム機能及びMHCクラスI抗原のプロセッシングを首尾よく阻害できる可能性がある（たとえば、MG115、MG132、MG262、PSI、クラスト-ラクタシスチン-ラクトン、エポキシマイシン）。プロテアソーム阻害剤の適用は、パルス標識又は追跡を行う前、その最中、あるいはその後、クラミジアの発生サイクル中の何れの時点でも行うことができる。

10

20

【0029】

#### 宿主細胞

宿主細胞とは、細胞内細菌によって感染させることができる真核生物細胞である。

当業者は、上皮細胞系（たとえば、HeLa、Hep-2、BHK細胞）又は固定化単核細胞系（たとえば、U-937）を含む広範囲の固定化細胞系が、クラミジアによる感染に適した宿主であることを理解するであろう。固定化宿主細胞は天然に存在する癌腫から、あるいは発癌性遺伝子を保有し、無制限の細胞分裂及び増殖をもたらすウイルス（たとえばSV40）を用いた、初代細胞の形質転換によって得ることができる。宿主細胞の定義は、初代の上皮性又は内皮性哺乳動物細胞系も含み、これらは生きている哺乳動物から、あるいは剖検によって得ることができ、in vitroにおいて限られた時間増殖させることができ、器官の細胞の培養物であってよい。

30

【0030】

#### 遺伝的に改変された宿主細胞

当業者は、適切な宿主細胞として、クラミジアワクチンの開発過程と関連がある遺伝子、たとえば、プロテアソームのサブユニットをコードする遺伝子、又はMHCクラスIの提示と関連がある機能的に重要なタンパク質をコードする他の遺伝子を過剰発現又は抑制するために、遺伝的に改変されている宿主細胞も含まれることを理解するであろう。

40

【0031】

プロテアソーム プロテアソームは、非リソソームタンパク質分解の主な酵素複合体であり、多くの律速酵素、転写調節物質及び重要な調節タンパク質の迅速な分解を触媒する、ATP依存性タンパク質分解経路の必須成分である。

真核生物では、異常なタンパク質、凝集した、折りたたまれていない、若しくは正常な宿主細胞のタンパク質、及び宿主細胞中に存在する細胞内細菌由来のタンパク質を迅速に除去することが必要である。高等な真核生物のプロテアソームは、タンパク質をペプチドに分解するMHCクラスI抗原のプロセッシングと非常に関連があり、ペプチドはT細胞エピトープとして提示されるために宿主細胞の表面に送達される。

【0032】

50

パルス標識

タンパク質の標識とは、放射性同位体（たとえば L - [ <sup>35</sup>S ] - メチオニン、L - [ メチル - <sup>3</sup>H ] - メチオニン、L - [ メチル - <sup>14</sup>C ] - メチオニン、[ <sup>35</sup>S ] - シスチン、[ <sup>3</sup>H ] - トリプトファン又はこれらの組合せ）を含むアミノ酸を、宿主細胞のタンパク質合成を真核生物のタンパク質合成に対する十分な濃度の阻害剤を使用して阻害する一定の時間内（たとえば 0.5 時間、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間）で、細菌タンパク質中に組み込ませることを意味する。

標識は、クラミジアの発生サイクルを通して行うことができる。標識培地は、感染細胞が増殖する最中に、宿主細胞と病原体の両方の増殖を可能とするように、栄養素を充分豊富にしなければならない。宿主細胞のタンパク質合成の阻害は、標識時間中に、シクロヘキサミド又は他の宿主細胞のタンパク質合成に対する阻害剤（たとえばエメチン）を加えることによって行うことができ、タンパク質を合成する細胞内細菌中のみへ、放射性アミノ酸の取り込みを可能にする効果がある。細胞透過性のタンパク質分解に対する阻害剤を、標識時間中に増殖培地に加えることによって、タンパク質分解を延長させることができる。本発明は放射性標識体の使用に限らないことを注意しなければならない。

10

**【 0 0 3 3 】**パルス追跡

標識タンパク質をその合成後に追跡することによって、代謝回転時間、たとえば、標識時間中に合成されたタンパク質の量が好ましくは 75% を超えて（たとえば、80%、90%、95%、99%、100%）低下する時間を評価することができる。この評価は、追跡時間の前後で、ゲル中の所定タンパク質スポットの光学密度を測定することによって行い、これによって、どのくらいの長い時間、タンパク質が感染細胞中に存在するかが明らかになる。追跡は、標識培地を、放射性アミノ酸を含まない増殖培地に置換し、標識後の異なる時点で感染細胞を採取することによって行う。追跡は、標識後の時間を変えて行ない（たとえば、0.5 時間、1 時間、1.5 時間、2 時間、6 時間、12 時間、24 時間、72 時間）、標識後のさまざま時点で、どのくらいの長い時間、タンパク質が感染細胞中に存在するかを決定することができる。あるタンパク質の成熟形は、プロペプチドからプロセッシングされることがあり、その結果、追跡時間中に検出量の低下と引き換えに当該成熟形が蓄積する。このような状況下では、追跡時間中の分解を可視化できる前に、成熟タンパク質が蓄積する可能性がある。タンパク質が分解する時間は、細胞透過性であるタンパク質分解の阻害剤を追跡中に増殖培地に加えることによって、延長させることができる。

20

30

**【 0 0 3 4 】**溶解バッファー

本発明において使用する溶解バッファーは、2次元ゲル電気泳動の前に、感染細胞を溶かしタンパク質を可溶化するために使用されるバッファーである。

**【 0 0 3 5 】**

溶解バッファーは、9 M の尿素、4 % w / v の 3 - [ ( 3 - コラミドプロピル ) ジメチルアンモニウム ] - 1 - プロパンスルホン酸 ( CHAPS ; Roche , Germany )、40 mM の Tris Base、65 mM の DTE、及び 2 % vol / vol の Pharmalyte 3 ~ 10 ( Amersham Pharmacia Biotech ) を含む。高分子量で疎水性のタンパク質を濃縮するために、溶解用バッファーは、7 M の尿素、2 M のチオ尿素、4 % w / v の 3 - [ ( 3 - コラミドプロピル ) ジメチルアンモニウム ] - 1 - プロパンスルホン酸 ( CHAPS ; Boehringer Mannheim , Germany )、40 mM の Tris Base、65 mM のジチオエリトリール ( DTE )、及び 2 % vol / vol の Pharmalyte 3 ~ 10 ( Amersham Pharmacia Biotech ) を選択的に含ませてもよい。

40

**【 0 0 3 6 】**

ある特定のタンパク質の溶解度を増大させるために、溶解バッファーを変え得ることは理解される（たとえばチオ尿素は、疎水性で高分子量であるタンパク質の溶解度を増大させ

50

ることができるであろう)。

【0037】

#### 分泌エフェクタータンパク質

分泌エフェクタータンパク質という用語は、細菌によって宿主細胞の細胞質又は細胞内オルガネラに分泌される、タンパク質を意味する。

分泌エフェクタータンパク質は、宿主/病原体の関係に対して多大な影響を有している可能性があり、宿主細胞の細胞質におけるその存在により、プロテアソームに標的にされ、宿主細胞の表面上でMHCクラスI抗原として提示される可能性がある。分泌エフェクタータンパク質は、文献に記載されているいくつかのSec依存又は独立系(たとえばI型、II型、III型、VI型)の1つによって分泌されるものと思われる。

10

【0038】

#### 細胞内細菌

真核生物の宿主細胞内で感染し増殖する能力を有する細菌(たとえばクラミジア、サルモネラ、シゲラ、リステリア、レジオネラ、エルニシア)。

この定義は、真核生物の宿主細胞を使用するのみ生存及び増殖することができることを意味する偏性の細胞内細菌、あるいは細胞外及び細胞内環境の両方で生存することができることを意味する通性の細胞内細菌である、細胞内細菌を含む。

【0039】

#### 基本小体(EB)

超遠心分離によって精製し、電子顕微鏡によって直径約300nmであり凝縮核を有するとして特徴付けした、クラミジア細菌の集合体。

20

【0040】

#### 網状体(RB)

超遠心分離によって精製し、電子顕微鏡によって直径約1000nmであり正常な細菌の核を有するとして特徴付けした、クラミジア細菌の集合体。

【0041】

#### 分析ゲル

タンパク質を可視化するのに必要な量のタンパク質サンプルが載せられた、2次元PAGEゲル。本明細書に記載した実施例において分析目的で適用された量は、典型的には200.000~300.000計数毎分(cpm)であり、染色ゲル(たとえば銀染色、クーマシー染色)では>100µgタンパク質である。

30

【0042】

#### 有意に低下した強度/量

二次元PAGEゲル上に局在する所定スポットの全領域の平均光学密度において、好ましくは10%を超える(たとえば20%、35%、50%、65%、80%、90%、100%)再現性のある検出可能な低下。

【0043】

#### 有意に増大した強度/量

二次元PAGEゲル上に局在する所定スポットの全領域の平均光学密度において、好ましくは10%を超える(たとえば20%、30%、45%、60%、75%、90%、100%、150%、200%、300%以上)再現性のある検出可能な増大。

40

【0044】

#### 調製用ゲル

本明細書に記載した同定法(たとえばMALDI-MS、ESI-Q-TOF、エドマン分解法)の1つによって、特異的なタンパク質スポットを同定するのに必要な量のタンパク質サンプルを載せた、二次元PAGEゲル。

典型的には>500µgを、使用する固定pH勾配に応じて、調製目的でゲルに載せる。本発明において使用する調製用ゲルの定義は、PVDF膜上に、非固定であるか又は染色プロトコル(たとえば銀染色、クーマシー染色)を使用して固定されている、あるいはエレクトロブロットティングされている、タンパク質を有するゲルを含む。非標識タンパク質

50

と共に分離されるバックグラウンド量の標識タンパク質を調製用ゲルに適用することによって、調製用ゲル上のタンパク質を目に見えるようにすることが可能である。このようなゲルと分析ゲルを比較して、目的のタンパク質を正確に取り出すことも可能である。

【0045】

#### ワクチン候補

本発明の方法によって得られる結果に基づいて、潜在的に細胞内細菌から分泌されるタンパク質。

分泌タンパク質は、宿主細胞のプロテアソームによる分解を受けやすいため、これらのタンパク質に由来するペプチドが、感染細胞の表面上でMHCクラスI抗原として提示される可能性があり、かくしてT細胞によって認識可能となる。したがって、このようなタンパク質は、細胞内細菌に対するワクチンの開発に関する明白な標的であろう。ワクチン候補として記載したタンパク質は、診断試験の成分として有用でもある。

10

【0046】

#### ワクチン

本発明においてワクチンという用語は、適応免疫（体液性又は細胞性）を誘導することができる免疫原組成物として、広い意味で理解すべきである。

適応免疫を誘導することができるワクチン候補は、溶液、懸濁液又は乳濁液のいずれかの形態において、注射可能物質として、動物又はヒト受容対象に投与することができる。免疫原組成物の活性成分であるワクチン候補は、受容対象に注射する前に、水、生理食塩水、グリセロール及びエタノールなどの、薬剤として許容される賦形剤と混合することができる。注射は異なる方法で行うことができる（たとえば皮下に、あるいは筋肉内に）。ワクチン候補は、i) その完全長の、あるいはii) 免疫原断片、たとえばT細胞エピトープを与えるための起源としての、ワクチンを供給することができる。特定のタンパク質又はペプチドを単独で、あるいは他のタンパク質又はペプチドと組み合わせて、動物又はヒト受容対象に投与し、ワクチンとして寄与させ得ることは認知されている。

20

【0047】

さらに、ワクチン候補タンパク質をコードするDNA断片を、ベクター中でクローニングさせることができ、これを注射によって動物又はヒト受容対象中に導入することができる。DNA断片はたとえば筋肉細胞によって取り込まれ、プロモーターの制御下で発現し、真核生物中で活性化するのである。このいわゆるDNAワクチンにおいて、発現したDNA断片は、免疫系を刺激することができる。

30

【0048】

#### MHCクラスI抗原

主要組織適合性クラスI抗原は、宿主細胞の細胞質に曝されているタンパク質由来のペプチドを含み、小胞体中のヘテロ二量体型MHCクラスI分子に結合しており、（ヒトの）HLA複合体の溝中で結合した細胞の表面上で提示され、この場合に、この抗原がT細胞エピトープとして働くことができる。大部分のMHCクラスI提示ペプチドは、宿主細胞の細胞質中で活性化26Sプロテアソームによってプロセッシングされた、タンパク質に由来する。

【0049】

#### HLA

ヒト白血球抗原、ヒトの主要組織適合性複合体の名称。

【0050】

#### T細胞エピトープ

細胞の表面上の二量体型MHCクラスI分子に結合し、特定の細胞傷害性T細胞の受容体によって認識されることができ、典型的には8～10個のアミノ酸からなる、短い長さのペプチド。

【0051】

#### 全細胞溶解物

事前の精製又は分別なしで、溶解バッファー中に直接採取した感染宿主細胞。

40

50

全細胞溶解物は、クラミジアの発生サイクル中の任意の時点で得ることができ、全細胞溶解物は、細菌由来のタンパク質を含めて、感染宿主細胞中に存在するすべてのタンパク質の混合物を含むであろうことが理解される。

#### 【0052】

##### 精製した細菌

感染細胞から精製した細菌。

一例としてクラミジアを使用する場合は、クラミジアを採取する発生サイクル中の時点に応じて、密度勾配超遠心分離法によって、クラミジアのRBとEBの両方、並びに中間形を精製することが可能である。純度は、電子顕微鏡法によって測定することができる。本発明において、非常に豊富な宿主細胞のタンパク質（たとえばアクチン、 チューブリン、 チューブリン、カルレチキュリン）への混入による、ゲル上に存在するすべてのタンパク質の全体の光学密度に対する貢献を評価することによって、純度は銀染色された二次元ゲル上でも容易に確認される。

10

#### 【0053】

##### 同定したタンパク質

質量分析又はエドマン分解法に基づく同定法を使用して同定したタンパク質の名称を、Chlamydia Genome Projectの利用可能で以下のものに公開されている<http://socrates.berkeley.edu:4231/>中の遺伝子に関して使用したものに従い且つこれと適合性がある命名法に従って示した。

i) Stephens, R. S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R. L., Zhao, Q., Koonin, E. V., Davis, R. W. (1998) ヒト、Chlamydia trachomatisの真性細胞内病原体のゲノム配列 (Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis.) Science 282: 754~759

20

ii) Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C., Fan, J., Hyman, R. W., Olinger, L., Grimwood, J., Davis, R. W., Stephens, R. S. (1999). Chlamydia pneumoniaeとChlamydia trachomatisの類似したゲノム (Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis.) Nat Genet. 21: 385~389

30

#### 【0054】

##### ELISPOT

ELISPOT法では、in vitroにおいて抗原を用いて刺激したT細胞を、抗サイトカイン（たとえばIFN-g、IL-6、TNF-a）抗体で事前にコーティングしたマイクロタイターウエル中でインキュベートする。インキュベーション時間の後に、活性化T細胞周辺のサイトカインの局所的な産生を、ホースラディッシュペルオキシダーゼアルカリペルオキシダーゼなどの酵素に結合した二次抗体を加えることによって、可視化することができる。サイトカインの産生の評価は、酵素によって着色物質に転換され、したがってサイトカイン産生細胞を可視化することができる基質を、最後に加えることを行う。

40

#### 【0055】

##### アジュバント

アジュバントは、哺乳動物受容対象の免疫応答を誘導することができる、特異的な免疫原を含む乳濁液を意味する（たとえばフロイントのアジュバント）。アジュバント及び免疫原は、乾燥細菌又は細菌生成物などの成分で補うことができ、これによって免疫処置した哺乳動物の免疫応答が高められるであろうことが理解される。また、リンホカイン（たと

50

えば、IFN $\gamma$ 、IL12)又はポリI:Cなどの免疫調節物質を、免疫原及びアジュバントと共に投与することもできる。

【0056】

#### 血清変換

抗原に対する応答による、異なるクラス又はサブクラスの抗体の出現。

【0057】

#### ミクロ免疫蛍光法(MIF又はミクロ-IF)

免疫蛍光顕微鏡による、固定細菌又はタンパク質に対する抗体を測定するアッセイ。

【0058】

#### 免疫原性

ヒト又は動物に注射することによって適応免疫を誘導することができる場合、タンパク質又はペプチドは免疫原性である。

【0059】

(発明の詳細な説明)

#### 全細胞溶解物及び精製した細菌における、二次元PAGEによるタンパク質プロファイルの比較

全感染細胞には存在するが精製した細菌には存在しないタンパク質は、細菌、たとえばクラミジアから分泌されていた可能性がある。したがって、本発明の最初の方法は、発生サイクルの異なる時点で標識した感染細胞の全細胞溶解物からの、[35S]標識したクラミジアのタンパク質の二次元PAGEによるタンパク質プロファイルと、対応する時点で[35S]標識した精製細菌の二次元PAGEによるタンパク質プロファイルと比較することである。この方法によって、全細胞溶解物のタンパク質プロファイル中には明らかに存在するが、精製した細菌のタンパク質プロファイル中には極僅か検出されるか存在しない、いくつかのタンパク質の検出が可能となる。

【0060】

これらの研究は、高解像度二次元PAGE(IPG)によって、感染後22~24時間で全細胞溶解物で可視化した、合計約600個のタンパク質スポットから、その強度が基本小体(EB)中で大幅に低下している、77のC. trachomatis Dタンパク質の存在を解明した。同様に、91のタンパク質は、感染後55~57時間から標識した全細胞溶解物と精製したEBとを比較すると、C. pneumoniae VR1310中で強度が大幅に低下していた。

【0061】

検出し検討を加えたタンパク質は、C. trachomatis Dに関しては表Iに列挙したタンパク質番号DT1~DT77で、C. pneumoniaeに関しては表IIに列挙したCP1~CP91で記載した、分子量(Mw)及び等電点(pI)を有する。

【0062】

この方法によって、さらに調査が必要な分泌されている可能性があるタンパク質の概要が与えられる。実施例では、i)全細胞溶解物の標識と対応する時点(C. trachomatis)図1、又は2)全発生サイクル中の各時点(C. pneumoniae、図2)のいずれかにおいて標識した、全細胞溶解物と精製EBの比較を示す。

【0063】

RBを精製することによって、分泌タンパク質とRB特異的タンパク質とを区別することができる。感染細胞の全溶解物のタンパク質プロファイルを、同じ時点において精製したRBのタンパク質プロファイルと比較して、分泌タンパク質を同定することができる。この手法では、RB特異的タンパク質が偽陽性として検出されることはないであろう。調査した時点で合成及び分泌されたタンパク質が、検出されるであろう。タンパク質は、他の時点で合成及び分泌されてもよい。

【0064】

この方法は、感染直後に分泌されたタンパク質の検出も含み、これは、前の発生サイクル中に合成されているかもしれない。これらのタンパク質は、前の発生サイクル中に標識し

10

20

30

40

50

たEBを感染させ、次に全細胞溶解物の二次元PAGEによって可視化する。EBがRBに分化する前の発生サイクルの初期段階に、サポニンを細胞膜に透過させることによって、宿主細胞の細胞質が得られる[30, 31]。この時期では破壊されたRBからのクラミジアのタンパク質の汚染はないと思われるので、このことが唯一可能となる。

【0065】

#### ワクチン候補の同定

調製用二次元ゲルから切除したワクチン候補タンパク質を、高度な質量分析法によって同定する。

【0066】

切除したスポットは、トリプシンなどの酵素で消化し、これによっていくつかのトリプシンペプチドが生じる。MALDI-MS又は他の手法によって、これらのペプチドの質量が、百万部当たり100部(ppm)より良い精度で決定される。得られた質量は、統計的基礎に基づき分析したタンパク質を同定することができるMS-Fit又はPeptide探索ソフトウェアを使用して、データベース中に存在するすべてのタンパク質における理論上のトリプシン切断生成物と整合させる。

【0067】

全細胞溶解物を載せたゲルからタンパク質スポットを切除するとき、汚染されている宿主細胞のタンパク質が細菌タンパク質と同じ位置に存在する可能性があり、さらに複雑なことに、1つのスポットが2つ以上の細菌タンパク質を含む可能性がある。明白な同定をもたらし得る汚染からの干渉を避けるために、必要な場合は、たとえばESI-Q-TOF又はpost source decay(PSD)を使用して、細菌タンパク質の配列情報を得ることができる。

【0068】

この方法は、表III(それぞれA及びB)中の、C. trachomatis D又はC. pneumonia VR1310からの例によって示されるように、質量分析によって同定されるタンパク質を含む。

【0069】

したがって、第一の態様では本発明は、細胞内細菌から分泌されるタンパク質を同定するための方法であって、

- 1) 細胞内細菌によって宿主細胞を感染させるステップと、
  - 2) 感染細胞中に存在する細胞内細菌を標識するステップと、
  - 3) a) 感染細胞の全細胞溶解物、及び
  - b) 感染細胞からの精製・溶解された細菌を調製するステップと、
  - 4) i) ステップ3 a)からの全細胞溶解物と、ii) ステップ3 b)からの精製・溶解細菌との、二次元ゲル電気泳動によるタンパク質プロファイルを比較するステップと、
  - 5) 全細胞溶解物中に存在するが、精製した細菌中には存在しないか、あるいは有意に低下した量で存在する、ステップ4)で得たタンパク質スポットを検出するステップと、
  - 6) ステップ5)で選択したスポット中のタンパク質を同定するステップ
- とを含む方法に関する。

【0070】

#### ワクチン候補のパルス/追跡

この方法の目的は、宿主細胞中で分解される分泌タンパク質を検出することである。同定したワクチン候補タンパク質が宿主細胞内に存在する時間を評価するために、一連のパルス/追跡研究を行う。[35S]標識したタンパク質の代謝回転時間を、標識後さまざまな時間でタンパク質を追跡することによって、二次元ゲル上でモニターリングする。代謝回転時間によって、どれだけ速くタンパク質が分解されるか、したがって、どれだけ長くタンパク質が感染細胞中に存在するかに関する、貴重な情報が与えられる。

【0071】

この方法によって、表Iに例示した分泌される可能性があるC. trachomatisのタンパク質の、推定代謝回転時間が与えられる。

## 【0072】

したがって、この本発明の他の態様では、本発明は、細胞内細菌から分泌されるタンパク質を同定するための方法であって、

- 1) 細胞内細菌によって宿主細胞を感染させるステップと、
- 2) 感染細胞中に存在する細胞内細菌をパルス標識するステップと、
- 3) ステップ2)の後の異なる追跡時間の後に、感染細胞の全細胞溶解物を調製するステップと、
- 4) ステップ3)で得た異なる追跡時間後に調製した全細胞溶解物の、二次元ゲル電気泳動によるタンパク質プロファイルと比較するステップと、
- 5) ステップ3)で追跡時間が増大する程少ない量で存在する、ステップ4)で得られたタンパク質スポットを検出するステップと、
- 6) ステップ5)で選択したスポット中のタンパク質を同定するステップとを含む、方法に関する。

10

## 【0073】

プロテアソーム阻害剤と組み合わせたパルス追跡

ワクチンに適した候補の数を限定するために、本発明は、パルス追跡による研究と組み合わせたプロテアソーム阻害剤を用いる方法を含む。これらの実験によって、分泌されるクラミジアタンパク質の代謝回転時間に対する宿主細胞プロテアソームの影響をモニタリングするための、優れたツールが提供される。

## 【0074】

MHCクラスI抗原として真核生物細胞の表面上に提示される免疫原性タンパク質は、偏在していなければならない、多機能触媒タンパク質複合体であるプロテアソームのタンパク質分解によって切断されなければならない。プロテアソームは、免疫原性タンパク質を、典型的には8~10個のアミノ酸長であるペプチドに切断する。これらのペプチドはER(小胞体)に運ばれ、そこでヘテロ二量体型MHCクラスI分子に結合し、その後MHC-抗原複合体は細胞の表面に運ばれる。細胞の表面上でMHC-抗原複合体は、細胞傷害性Tリンパ球上の特異的な受容体によって認識される(Rock and Goldberg [6.]中に概説されている)。

20

## 【0075】

ペプチドアルデヒドなどの細胞透過性プロテアソーム阻害剤を細胞培養物に加えることによって、真核生物のプロテアソームの活性を阻害し、MHCクラスIの提示を妨げることが可能である(Rock他、1994 [36.] )。プロテアソーム阻害剤を加えることによってその代謝回転時間が延長するクラミジアタンパク質は、おそらく細菌から分泌されており、その後プロテアソームによってプロセッシングされる。さらに、本発明におけるこの点は、宿主細胞中への放出後直ちにプロテアソームで分解されるためプロテアソーム阻害剤の存在下でのみ検出可能となる、クラミジアタンパク質の検出を可能とする。

30

## 【0076】

本発明は、プロテアソーム阻害剤によって影響を受ける、C. trachomatis D及びC. pneumonia VR1310というワクチン候補を含む。

## 【0077】

タンパク質DT1、DT2、DT3、DT5、DT9、DT10、DT11、DT13、DT14、DT36、DT47、DT59、DT60、DT61、DT62(以下の表I Vに述べるもの)は、追跡時間中にプロテアソーム阻害剤を加えることによってその代謝回転時間が延長する、C. trachomatis Dのワクチン候補の例である。

40

## 【0078】

本発明は、採取前、標識時間中にプロテアソーム阻害剤で処理したRBを、精製する方法も提供する。プロテアソーム阻害剤で処理した精製RBと同時に標識した、プロテアソーム処理した全細胞溶解物を比較することによって、どのタンパク質が宿主細胞の細胞質に分泌され、プロテアソームで分解されるかがさらに解明されるであろう。さらに、これらの実験の宿主細胞系を遺伝的に改変して、MHCクラスI拘束性T細胞エピトープのプロ

50

セッシングの要となる、遺伝子を過剰発現させることができる [ 38 , 39 , 40 ] ( S i j t s , 2000 , V a n H a l l , 2000 , S h o c k e t t , 1995 )。このような細胞系を使用することによって、プロテアソーム阻害剤の効果がより顕著になるであろう。したがって本発明は、MHCクラスI抗原の提示と関連がある遺伝子が遺伝的に改変されている、市販の宿主細胞系の使用も含む。

#### 【0079】

したがって、本発明は、他の態様において、細胞内細菌から分泌されるタンパク質を同定するための方法であって、

- 1) 細胞内細菌によって宿主細胞を感染させるステップと、
  - 2) それぞれプロテアソーム阻害剤の存在下及び不在下で、宿主細胞を培養するステップと、
  - 3) それぞれプロテアソーム阻害剤の存在下及び不在下で培養した、感染細胞中に存在する細胞内細菌を標識するステップと、
  - 4) 感染細胞の全細胞溶解物を調製するステップと、
  - 5) それぞれプロテアソーム阻害剤の存在下及び不在下で培養した、感染細胞の全細胞溶解物の二次元ゲル電気泳動によるタンパク質プロファイルを比較するステップと、
  - 6) プロテアソーム阻害剤の存在下で培養した全細胞溶解物中には存在するが、プロテアソーム阻害剤の不在下で培養した全細胞溶解物中には存在しないか、あるいは有意に低下した量で存在する、ステップ5)で得たタンパク質スポットを検出するステップと、
  - 7) ステップ6)で選択したスポット中のタンパク質を同定するステップ
- とを含む方法、に関する。

10

20

#### 【0080】

##### ポリクローナル抗体の生成

本発明は、ワクチン候補に特異的なポリクローナル抗体を提供する。ワクチン候補タンパク質をコードする遺伝子を、たとえばリガンド非依存性クローニング ( L I C ) 系を使用してクローニングする。ワクチン候補の配列を含む発現融合タンパク質を使用して、ウサギを免疫処置し、ワクチン候補に特異的なポリクローナル抗体 ( P A b ) を含む血清を得る。本発明は、二次元 P A G E 免疫プロット法において P A b を使用して、同時局在化により抗体の正確な特異性を確認するか、あるいは認識されていないイソ型のワクチン候補を同定する。本発明は、免疫プロット及び同時局在化により、表 I I I に例示したような

30

#### 【0081】

したがって本発明は、上記の態様の1つも提供し、その方法は、

- 1) 前述の方法のいずれかに従って同定した前記細胞内細菌からのタンパク質に対する抗体を得るステップと、
  - 2) ステップ1)で得た抗体を使用して、細菌を感染させた細胞の全細胞溶解物に二次元 P A G E 免疫プロット法を適用するステップと、
  - 3) ステップ2)において反応させたタンパク質スポットを検出するステップと、
  - 4) ステップ3)で選択したスポット中のタンパク質を同定するステップ
- とをさらに含む。

40

#### 【0082】

4つの態様の組合せも、本発明の一部である。

#### 【0083】

本発明の方法の好ましい実施形態では、[ 35 S ] シス테인、[ 35 S ] メチオニン、[ 14 C ] 標識アミノ酸、又はこれらの組合せなどの放射性手段によって、細胞内細菌の標識を行う。

#### 【0084】

選択したタンパク質スポット中のタンパク質を同定するための方法は、エドマン分解法、又は M A L D I T O F M S ( マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化法飛行時間質

50

量分析法)、ESI-Q-TOF MS(エレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間質量分析法)、PSD-MALDI MS(ポストソース分解MALDI質量分析法)などの任意の質量分析法、又はこのような方法の組合せに基づいて行なうことができる。さらに、タンパク質は、同定に先立って、臭化シアン処理又はヒドロキシルアミン処理などの化学的方法、或いはトリプシン、スリモトリプシン、キモトリプシン、若しくはペプシン、又はこれらの組合せなどの任意の適切な酵素を用いる酵素的方法によって、切断することができる。

【0085】

細胞内細菌は、通性細胞内細菌又は偏性細胞内細菌であってよく、*C. pneumoniae*、*C. trachomatis*、*C. psittacii*又は*C. pecorum*などのクラミジア属からの細菌、これらの任意の特定の亜型或いは菌株を含むものが特に関連する。しかしながら、サルモネラ、シゲラ、エルニシア又はリステリアなどの他の細胞内細菌も、本発明に関して興味深いものである。

10

【0086】

本発明に従って使用する宿主細胞は、不死化細胞系、たとえばHeLa、Hep2、McCoy又はU937、哺乳動物ドナーから得たかあるいは剖検によって得た初代細胞系、遺伝的に改変された細胞系、或いは器官細胞の培養物などの当分野で知られている一般的な宿主細胞又は細菌が増殖することができるさらに他の細胞であってよい。宿主細胞は、細胞内細菌による感染の前又はその最中に、INF- $\gamma$ で処理することができ、かつ/あるいは、遺伝的に改変されていて、クラミジアワクチンの開発過程に関連していることが認められている遺伝子を、過剰発現又は抑制することができる。

20

【0087】

本発明の方法が1つ又は複数のプロテアソーム阻害剤を使用するとき、MG132、MG262、MG115、エポキシマイシン、PSI及びクラスト-ラクタシスチン-ラクトンなどの既知の阻害剤が、その使用に適している。

【0088】

本発明の方法は、その完全長で若しくはその免疫原性断片として、免疫原性組成物中に含めること、及び/又は診断目的に適しているタンパク質、特に免疫原性組成物中に含めることに適した抗原を限定する、MHCクラスI又はII、より好ましくはMHCクラスI拘束性抗原として提示するための候補であるT細胞エピトープを含むようなタンパク質の同定に特に関連する。

30

【0089】

したがって、本発明の他の重要な態様では、本発明は、特許請求した方法のいずれかによって同定可能なタンパク質、又はその免疫原性断片、好ましくは免疫原性組成物中に含めることに、かつ/あるいは診断目的に適用可能であるような、タンパク質及びその免疫原性断片に関する。

【0090】

本発明のタンパク質は、*C. trachomatis*及び*C. pneumoniae*から分泌されるタンパク質であってよい。このようなタンパク質は、たとえば、+/-10%の平均誤差で決定されるそれぞれ表I及びIIに与える等電点(pI)及び分子量(Mw)の値を有し、それぞれ表Iに与えるDT1~77、並びに表IIに与えるCP1~CP91として特徴付けられるタンパク質、及びその免疫原性断片である。

40

【0091】

【表1】

表 I

タンパク質 スポット	等電点 (P i)	分子量 (Mw)
DT1	4.45	23.5
DT2	4.55	23.5
DT3	4.55	34.5
DT4	4.75	36.1
DT5	4.83	11.4

タンパク質 スポット	等電点 (P i)	分子量 (Mw)
DT6	9.3	9.27
DT7	4.85-4.9	24.8
DT8	5.1	7.8
DT9	4.73	23.7
DT10	4.8	23.7
DT11	4.85	23.7
DT12	4.93	23.7
DT13	6.05	24.3
DT14	6.2	27.5
DT15	6.1	32.4
DT16	5.98	39
DT17	6.28	55.2
DT18	6.1	41.1
DT19	6.1	47.9
DT20	7.4	37.6
DT21	7.7	34.7
DT22	8.2	22.4
DT23	4.83	30.4
DT24	5	29.5
DT25	5	12.6
DT26	4.7	10.9
DT27	5.15	13.5
DT28	5.7	31.9
DT29	4.97	54.8
DT30	5.86	36
DT31	5.78	36.2
DT32	6.4	10.4
DT33	6.3	13.3
DT34	9.5	32.4

10

20

30

40

タンパク質 スポット	等電点 (P i)	分子量 (Mw)
DT35	8	46.5
DT36	7.49	40.6
DT37	7.15	37.6
DT38	7.24	34.5
DT39	7.44	46.5
DT40	6.4	67.2
DT41	5.04	56.4
DT42	8.5	32.9
DT43	8.5	30.5
DT44	8.66	42.6
DT45	8.85	43.1
DT46	4.4	87.6
DT47	5.4	41
DT48	7.36	24.2
DT49	9.25	47.4
DT50	5.0	94
DT51	5.35	100.5
DT52	5.41	59.7
DT53	5.97	23
DT54	6.12	25.5
DT55	5.34	36.4
DT56	4.88	10.5
DT57	4.87	18.5
DT58	6.14	97
DT59	4.5	19.7
DT60	5.5	40.9
DT61	5.5	39.9
DT62	5.98	41.1
DT63	6.9	46.8

10

20

30

40

タンパク質 スポット	等電点 (P i)	分子量 (Mw)
DT64	5.5	34.5
DT65	4.5	68.2
DT66	4.35	57.6
DT67	6.13	66.5
DT68	6	62.9
DT69	5.85	65.6
DT70	5.72	70.4
DT71	5.5	44
DT72	5.85	10.2
DT73	4.45	30.5
DT74	5.02	48.2
DT75	4.37	21.9
DT76	5.14	23.3
DT77	5.64	23.0

10

20

感染後24時間で全細胞溶解中に存在するが、EB中では有意に低下している、*C. trachomatis* Dから分泌される可能性のあるタンパク質、及び $\pm 10\%$ の平均誤差でのそれらの推定等電点 (P i) /分子量 (Mw) の一覧表

30

【 0 0 9 2 】

【 表 2 】

表 I I

名称	等電点 (P i)	分子量 (Mw)
CP01	5.5	100.4
CP02	6.7	91.0
CP03	5.3	75.2
CP04	5.4	68.7
CP05	5.4	72.8
CP06	5.5	68.6
CP07	5.6	80.5
CP08	5.7	74.1
CP09	6.0	77.8
CP10	6.0	71.2
CP11	6.1	82.6
CP12	6.2	68.4
CP13	6.2	72.0
CP14	5.4	64.8
CP15	5.5	63.7
CP16	5.8	61.1
CP17	5.8	102.4
CP18	6.1	63.6
CP19	6.1	61.0
CP20	6.5	64.0
CP21	6.6	63.7
CP22	5.0	60.9
CP23	5.0	60.5
CP24	5.6	60.4
CP25	5.7	50.2
CP26	6.3	57.0
CP27	6.3	52.8

10

20

30

40

名称	等電点 (P i)	分子量 (Mw)
CP28	6.4	48.5
CP29	4.9	50.6
CP30	5.0	48.6
CP31	4.9	473
CP32	4.7	42.1
CP33	4.9	439
CP34	5.0	39.3
CP35	5.1	42.9
CP36	5.2	42.1
CP37	5.3	40.7
CP38	5.4	40.7
CP39	5.6	40.3
CP40	5.6	41.6
CP41	5.9	41.8
CP42	6.4	38.4
CP43	6.2	44.3
CP44	6.5	45.3
CP45	6.8	45.3
CP46	4.6	38.6
CP47	4.6	37.8
CP48	5.1	35.8
CP49	5.3	38.9
CP50	5.5	38.9
CP51	5.6	33.6
CP52	5.7	33.7
CP53	5.9	34.9
CP54	6.2	34.8
CP55	6.2	34.7
CP56	6.3	34.8

10

20

30

40

名称	等電点 (P i)	分子量 (M <sub>w</sub> )
CP57	8.3	36.0
CP58	8.7	36.1
CP59	4.5	29.7
CP60	4.8	26.0
CP61	5.2	27.6
CP62	5.4	30.6
CP63	6.2	25.2
CP64	6.6	26.3
CP65	5.9	22.8
CP66	4.7	24.2
CP67	4.8	22.4
CP68	5.1	24.1
CP69	5.2	24.3
CP70	5.3	22.3
CP71	5.6	21.4
CP72	6.9	17.8
CP73	4.8	12.0
CP74	5.0	8.9
CP75	5.1	11.9
CP76	6.5	9.3
CP77	7.0	10.5
CP78	7.2	10.4
CP79	8.7	13.0
CP80	5.7	93.3
CP81	6.4	37.2
CP82	6.9	45.0
CP83	7.0	41.6
CP84	7.1	38.6
CP85	6.3	32.2

10

20

30

40

名称	等電点 (P i)	分子量 (Mw)
CP86	6.4	32.0
CP87	8.8	31.3
CP88	5.0	23.8
CP89	4.7	73.0
CP90	7.4	40.1
CP91	7.8	37.7

10

感染後55時間で全細胞溶解中に存在するが、EB中では有意に低下している、*C. pneumoniae*から分泌される可能性のあるタンパク質、及び $\pm 10\%$ の平均誤差でのそれらの推定等電点 (P i) /分子量 (Mw) の一覧表

20

## 【0093】

本発明のより好ましいタンパク質は、表I I I Aに与える*C. trachomatis*のタンパク質、CT017 (遺伝子名CT017)、CT044 (遺伝子名ssp)、CT243 (遺伝子名lpxD)、CT263 (遺伝子名CT263)、CT265 (遺伝子名accA)、CT286 (遺伝子名clpC)、CT292 (遺伝子名dut)、CT407 (遺伝子名dksA)、CT446 (遺伝子名euo)、CT460 (遺伝子名SWIB)、CT541 (遺伝子名mip)、CT610 (遺伝子名CT610)、CT650 (遺伝子名recA)、CT655 (遺伝子名kdsA)、CT668 (遺伝子名CT668)、CT691 (遺伝子名CT691)、CT734 (遺伝子名CT734)、CT783 (遺伝子名CT783)、CT858 (遺伝子名CT858)、CT875 (30 遺伝子名CT875)、又はORF5 (遺伝子名ORF5)として*Chlamydia Genome*プロジェクト中の対応する遺伝子番号により同定されるタンパク質、あるいはタンパク質名DT8によって同定されるタンパク質など、及び*C. pneumoniae*のタンパク質、表I I I Bに与えるCPN0152 (遺伝子名CPN0152)、CPN0702、CPN0705 (遺伝子名CPN0705)、CPN0711 (遺伝子名CPN0711)、CPN0998 (遺伝子名ftsH)、CPN0104 (遺伝子名CPN0104)、CPN0495 (遺伝子名aspC)、CPN0684 (遺伝子名parB)、CPN0796 (遺伝子名CPN0796)、CPN0414 (遺伝子名accA)、CPN1016 (遺伝子名CPN1016)、CPN1040 (遺伝子名CPN1040)、CPN0079 (遺伝子名R110)、CPN0534 (遺伝子名dksA)、40 CPN0619 (遺伝子名ndk)、CPN0711 (遺伝子名CPN0711)、CPN0628 (遺伝子名rs13)、CPN0926 (遺伝子名CPN0926)、CPN1063 (遺伝子名tpiS)、又はCPN0302 (遺伝子名lpxD)として、対応する遺伝子番号により同定されるタンパク質など、及びその免疫原性断片である。

## 【0094】

## 【表3】

表IIIA

タンパク質 スポットの番号	遺伝子の番号*	遺伝子名	同定の方法	等電点 (P I)	分子量 (Mw)
DT1	CT668	CT668	M,Q,I	4.45	23.5
DT2	CT668	CT668	M,Q,I	4.55	23.5
DT3	CT783	CT783	M,Q,I	4.55	34.5
DT4	CT858	CT858	M,Q,I	4.75	36.1
DT48	CT858	CT858	M,I	7.36	24.2
DT7	CT610	CT610	M,E,I	4.85-4.9	24.8
DT9	CT610	CT610	I	4.73	23.7
DT10	CT610	CT610	I	4.8	23.7
DT11	CT610	CT610	I	4.85	23.7
DT12	CT610	CT610	I	4.93	23.7
DT8	None	DT8*	Q,I	5.1	7.8
DT6	CT460	SWIB	M	9.3	9.27
DT14	ORF5	ORF5	M	6.2	27.5
DT22	CT446	euo	Q	8.2	22.4
DT23	CT541	mip	M	4.83	30.4
DT24	CT541	mip	M	5	29.5
DT25	CT407	dksA	M,Q	5	12.6
DT26	CT734	CT734	Q,I	4.7	10.9
DT27	CT292	dut	M,Q	5.15	13.5
DT28	CT655	kdsA	M,E	5.7	31.9
DT30	CT265	accA	M	5.86	36
DT35	CT017	CT017	M	8	46.5
DT39	CT017	CT017	M	7.44	46.5
DT36	CT243	lpxD	M	7.49	40.6
DT37	CT650	recA	M,E	7.15	37.6
DT57	CT044	ssp	M	4.87	18.5

10

20

30

40

タンパク質 スポットの番号	遺伝子の番号*	遺伝子名	同定の方法	等電点 (P I)	分子量 (Mw)
DT58	CT286	clpC	M	6.14	97
DT69	CT875	CT875	M	5.85	65.6
DT76	CT691	CT691	Q	5.14	23.3
DT77	CT263	CT263	Q	5.64	23.0

【 0 0 9 5 】

【 表 4 】

表III B

タンパク質 スポットの番号	遺伝子の番号	遺伝子名	同定の方法	等電点 (P I)	分子量 (Mw)
CP34	CPN1016	CPN1016	I	5.0	39.3
CP37	CPN0998	ftsH	M	5.3	40.7
CP42	CPN0104	CPN0104	M	6.4	38.4
CP46	CPN0796	CPN0796	Q	4.6	38.6
CP47	CPN0705	CPN0705	M	4.6	37.8
CP50	CPN0495	aspC	M	5.5	38.9
CP52	CPN0152	CPN0152	M	5.7	33.7
CP55	CPN0684	parB	M	6.2	34.7
CP56	CPN0414	accA	M	6.3	34.8
CP63	CPN1016	CPN1016	M	6.2	25.2
CP71	CPN1040	CPN1040	M	5.6	21.4
CP72	CPN0079	rl10	M	4.8	12.0
CP73	CPN0534	dksA	M	5.0	8.9
CP75	CPN0619	ndk	M	5.1	11.9
CP76	CPN0711	CPN0711	M	6.5	9.3
CP78	CPN0628	rs13	M	7.2	10.4
CP79	CPN0926	CPN0926	M	8.7	13.0
CP88	CPN1063	tpiS	M	5.0	23.8
CP91	CPN0302	lpxD	M	7.8	37.7

同定したA : *C. trachomatis* D及びB : *C. pneumoniae* のワクチン候補の例の一覧表。  
M : MALDI-MS, Q : ESI-Q-TOF MS, P : PSD-MALDI MS, I :  
ウェスタンブロット法。  
\*DT8は*C. trachomatis* Dのゲノムには示されていない。新規なオープンリーディング  
フレームによってコードされる発現タンパク質を示す。

## 【0096】

図10中に示すタンパク質DT4、DT23、DT47、DT48、DT75、DT76  
及びDT77、及び図11中に示すタンパク質CP34、CP37、CP46、CP47  
、CP52、CP63及びCP75は、非常に関連がある。本発明のさらに好ましいタン  
パク質は、プロテアソーム阻害剤の存在下で長い代謝回転時間を有し、+/-10%の平  
均誤差で決定される表IVに与えたタンパク質DT1、DT2、DT3、DT5、DT9  
、DT10、DT11、DT13、DT14、DT17、DT47、DT59、DT60  
、DT61又はDT62の1つの等電点(pI)及び分子量(Mw)特性を有することに

10

20

30

40

50

よって特徴付けられるタンパク質である、*C. trachomatis*のタンパク質である。同様にプロテアソーム阻害剤によって制御される*C. pneumoniae*からのタンパク質も、本発明の好ましい実施形態である。

【0097】

【表5】

表IV

スポットの番号	遺伝子名	等電点 (PI)	分子量 (Mw)	MG115による影響	MG132による影響	PSIによる影響	エポキマイシンによる影響	クレスト-フラクタシソ-β-アラクトンによる影響
DT1	CT668	4.45	23.5	+	+			
DT2	CT668	4.55	23.5	+	+			
DT3	CT783	4.55	34.5	+	+			
DT5		4.83	11.4	+	+			
DT9	CT610	4.73	23.7	+	+			
DT10	CT610	4.8	23.7	+	+			
DT11	CT610	4.85	23.7	+	+			
DT13		6.05	24.3	+	+	+		
DT14	ORF5	6.2	27.5	+	+			
DT17		6.28	55.2	+	+			
DT47		5.4	41	+	+	+	+	
DT59		4.5	19.7	+	+			
DT60		5.5	40.9	+	+	+	+	
DT61		5.5	39.9	+	+	+	+	
DT62		5.98	41.1	+	+	+	+	

標識中及び追跡中に、異なるプロテアソーム阻害剤を用いた処理によってその代謝回転時間が延長される。同定した*C. trachomatis* Dのタンパク質の例の一覧表。

【0098】

本発明の他の好ましいタンパク質は、特許請求の範囲で定義する、配列番号1の配列を含む*Chlamydia trachomatis*のポリペプチドDT8、及びその免疫原性断片である。

【0099】

本発明のこの態様の他の好ましい実施形態では、このタンパク質は、本発明のタンパク質

又はその断片と、少なくとも40%の配列同一性、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、さらに好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有し、あるいはそれは、本発明のタンパク質の少なくとも7個の連続したアミノ酸を含む。

【0100】

本発明の他の態様においては、それは本発明のタンパク質又はその免疫原性断片をコードする配列を含む、核酸化合物に関する。

【0101】

好ましい核酸化合物は、配列番号1の配列を含むポリペプチドDT8をコードする配列(配列番号2)を含む、核酸化合物である。

10

【0102】

他の態様では本発明は、本発明の核酸化合物を含むベクター、及びこのベクターで形質転換又はトランスフェクトした宿主細胞に関する。

【0103】

本発明は、前記タンパク質に対する抗体を産生させるための本発明のタンパク質又はその免疫原性断片の使用、細胞内細菌に対する抗体を産生させるための方法であって、本発明のタンパク質又はその免疫原性断片を産生動物に投与し、かつ抗体をそこから精製する方法、及びこの方法によって得ることができる抗体も提供する。

【0104】

さらに、他の態様では本発明は、本発明のタンパク質又はその断片を含む薬剤組成物又は診断組成物、本発明の抗体又は核酸化合物、及び診断試薬の調製における、タンパク質又はその断片、抗体又は核酸化合物の使用を提供する。

20

【0105】

ワクチン候補からのT細胞エピトープの同定

本発明は、本発明において同定したタンパク質の配列からコンピュータに基づく方法によって予測されるように、あるいは実施例中にさらに記載するようなアッセイにより実験的に決定されるように、MHCクラスI抗原として表面に露出しておりT細胞刺激効果を有する可能性がある、T細胞エピトープを提供する。

【0106】

したがって、本発明の他の重要な態様は、MHCクラスI抗原として表面に提示されておりT細胞刺激効果を有する可能性がある、ペプチドエピトープである。このことに従って、本発明は、細胞内細菌からの分泌タンパク質上のT細胞エピトープを同定するための方法であって、本発明の方法によって同定したタンパク質又はその免疫原性断片、及びペプチドエピトープに関する、コンピュータによる予測、MHCクラス分子の結合アッセイ及び/又はELISPOTアッセイなどのステップを含む方法を提供する。この態様の一部として、本発明は、前記ペプチドエピトープをコードする配列を含む核酸化合物、及び核酸化合物を含むベクター、及び前記ベクターを用いて形質転換させた宿主細胞も提供する。

30

【0107】

本発明の好ましいペプチドエピトープは、本発明のタンパク質の4~25個の連続したアミノ酸、好ましくは6~15個、さらに好ましくは7~10個のアミノ酸を含む。

40

【0108】

本発明のより好ましい実施形態では、エピトープは、C. trachomatis又はC. pneumoniaeのタンパク質の7~10個の連続したアミノ酸を含む。

【0109】

本発明の他の好ましいペプチドエピトープは、配列番号1の配列を含むポリペプチドの4~25個の連続したアミノ酸、より好ましくは6~15個、最も好ましくは7~10個のアミノ酸を含む、エピトープである。

【0110】

配列番号3~配列番号45の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、Chlamydia

50

a t r a c h o m a t i s のペプチドエピトープ、配列番号46～配列番号121の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、C h l a m y d i a p n e u m o n i a のペプチドエピトープ、配列番号122～配列番号148の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、C h l a m y d i a p n e u m o n i a のペプチドエピトープ、及び配列番号149～配列番号194の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、C h l a m y d i a t r a c h o m a t i s のペプチドエピトープは、非常に関連がある。同定した本発明のエピトープは、表V～VIIでさらに特徴付けする。

【0111】

【表6】

表V

タンパク質 ID	位置	ペプチド配列	A 2 結合
CT263	181	KLAEAIFPI	8
CT263	170	FLKNNKVKL	123
CT263	56	ALSPPPSGY	210
CT263	141	FIAKQASLV	210
CT263	17	TLSLFPPSL	286
CT263	147	SLVACPCSM	332
CT263	6	LIFADPAEA	386
CT263	4	LLLIFADPA	438
CT541	4	ILSWMLMFA	38
CT541	94	KQMAEVQKA	89
CT541	9	LMFAVALPI	122
CT541	135	KLQYRVVKE	221
CT541	118	FLKENKEKA	222
CT541	46	KLSRTFGHL	239
CT541	223	SLLIFEVKL	265
CT541	148	VLSGKPTAL	352
CT541	204	VLYIHPDLA	398
CT541	54	LLSRQLSRT	472
CT691	172	LLQRELMKV	9
CT691	25	STINVLFPPL	66
CT691	15	PLQAHLELV	114
CT691	6	SLFGQSPFA	194
CT691	212	KLAYRVSM T	251
CT691	194	VLWMQIIKG	284
CT691	29	VLFP LFSAL	298
CT691	122	FLQKTVQSF	468

10

20

30

40

CT691	8	FGQSPFAPL	480
CT858	85	VLADFIGGL	33
CT858	177	RMASLGHKV	52
CT858	92	GLNDFHAGV	90
CT858	490	FSCADFFPV	90
CT858	379	MLTDRPLEL	101
CT858	408	LLENVDTNV	121
CT858	391	RMILTQDEV	132
CT858	491	SCADFFPVV	132
CT858	519	FVFNVQFPN	132
CT858	372	YLYALLSML	247
CT858	539	SLAVREHGA	288
CT858	109	YLPYTVQKS	350
CT858	219	ATIAPSIRA	358
CT858	140	LLEVDGAPV	375
CT858	512	RTAGAGGFV	384
CT858	250	SLFYSPMVP	431

10

20

同定した*C. trachomatis* のタンパク質から予想されるエピトープ

30

【 0 1 1 2 】

【 表 7 】

表V I

タンパク質 ID	位置	ペプチド配列	A 2 結合
CPN0152	6	FLVSCLFSV	18
CPN0152	135	YLRDAQTIL	28
CPN0152	237	LLIRIQDHV	48
CPN0152	100	KLGRKFAAV	51
CPN0152	266	LVSRTQQTL	164
CPN0152	10	CLFSVAIGA	190
CPN0152	222	GFGPPPIIV	354
CPN0152	249	SLPTKPYIL	387
CPN0152	240	RIQDHVTAN	408
CPN0152	15	AIGASAAPV	410
CPN0152	156	RLGISGFSL	444
CPN0619	64	FMVSGPVVV	31
CPN0619	73	LVLEGANAV	398
CPN0705	164	FVGANLTLV	24
CPN0705	89	CLAENAFAG	114
CPN0705	233	KIEEVQTPL	116
CPN0705	211	ALKGHQLTL	178
CPN0705	190	QMAEAADLV	358
CPN0796	583	FMGAHV FAS	15
CPN0796	419	LLIQHSAKV	31
CPN0796	372	FLCPFQAPS	39
CPN0796	376	FQAPSPAPV	50
CPN0796	211	AMNACVNGI	86
CPN0796	548	FMGIQVLHL	112
CPN0796	74	RHAAQATGV	134
CPN0796	328	FQYADGQMV	148

10

20

30

40

CPN0796	618	SVSAMGNFV	212
CPN0796	460	FLSYRSQVH	214
CPN0796	53	FLLTAIPGS	218
CPN0796	38	VLTPWIYRK	219
CPN0796	656	SVVMNQQPL	221
CPN0796	408	SLKNSQQQL	279
CPN0796	162	MLPDTLDSV	284
CPN0796	511	ALPYTEQGL	295
CPN0796	523	VLSGFGGQV	399
CPN0998	22	LLFGVWFGV	8
CPN0998	174	SLQERYPTL	29
CPN0998	416	MLLKGQNKV	33
CPN0998	379	FTFLPIILV	53
CPN0998	754	FLGDISSGA	56
CPN0998	36	FLAGKKARV	66
CPN0998	824	LLDAAAYQRA	66
CPN0998	374	YLGYLFTFL	78
CPN0998	377	YLFTFLPII	109
CPN0998	717	SLGATHFLP	124
CPN0998	96	ELIDQGHRL	134
CPN0998	381	FLPIILVLL	197
CPN0998	386	LVLLFVYLV	219
CPN0998	161	VTGPATPQL	223
CPN0998	319	SLEKQDPEV	224
CPN0998	567	ILMAATNRP	236
CPN0998	230	LTQETDTEA	237
CPN0998	823	MLLDAAYCF	238
CPN0998	639	LLNEAALLA	254
CPN0998	736	ELYDQLAVL	256

10

20

30

40

CPN0998	199	LIGKYLSPV	294
CPN0998	454	SLGGRIPKG	303
CPN0998	781	GMSPQLGNV	306
CPN0998	645	LLAARKDRT	315
CPN0998	424	VTFADVAGI	427
CPN0998	154	VLTEPLVVT	439
CPN0998	66	KIALNDNLV	470
CPN1016	5	KLGAIVFGL	7
CPN1016	135	YLGDEILEV	34
CPN1016	284	FLPTFGPIL	99
CPN1016	439	SLQNFSQSV	108
CPN1016	414	FTDEQAVAV	145
CPN1016	92	SLNDYHAGI	164
CPN1016	392	RMIFTQDEV	175
CPN1016	64	TQQARLQLV	294
CPN1016	217	SLVAPLIPE	312
CPN1016	255	YMVPYFWEE	358
CPN1016	576	YVEAVKTIV	389
CPN1016	395	FTQDEVSSA	444
CPN1016	516	GAGGFVFQV	491
CPN1016	464	LLGFAQVRP	498

10

20

30

同定した *C. pneumoniae* のタンパク質から予想されるエピトープ

【 0 1 1 3 】

【 表 8 】

40

表VII

タンパク質ID	位置	ペプチド配列	A2結合
CPN0412 (CT263)	186	RLEEVSQKL	80
CPN0412 (CT263)	103	LTTDTPPVL	103
CPN0412 (CT263)	147	KLLDMEGYA	167
CPN0412 (CT263)	110	VLSEDPPYI	183
CPN0412 (CT263)	62	ALQSYCQAY	215
CPN0412 (CT263)	193	KLTQTLVEL	248
CPN0412 (CT263)	81	FVGACSPEI	267
CPN0412 (CT263)	102	NLTTDTPPV	286
CPN0412 (CT263)	205	LMERAIPPK	410
CPN0661 (CT541)	103	KMAEVQKLV	46
CPN0661 (CT541)	199	ALGMQGMKE	221
CPN0661 (CT541)	54	KLSRTFGHL	239
CPN0661 (CT541)	232	LLIFEINLI	334
CPN0661 (CT541)	8	VLATVALAL	391
CPN0661 (CT541)	187	ILLPLGQTI	396
CPN0661 (CT541)	212	VLYIHPDLA	398
CPN0661 (CT541)	7	LVLATVALA	413
CPN0681 (CT691)	29	YMLPIFTAL	40
CPN0681 (CT691)	136	LLHEFNQLL	66
CPN0681 (CT691)	172	VLQRELMQI	91
CPN0681 (CT691)	15	PLQAHLEMV	169
CPN0681 (CT691)	6	RLFGQSPFA	197
CPN0681 (CT691)	73	GLFMPISRA	223
CPN0681 (CT691)	212	KLAHRINMT	229
CPN0681 (CT691)	194	YLWLQVIRR	322
CPN0681 (CT691)	135	TLLHEFNQL	474
CPN0681 (CT691)	8	FGQSPFAPL	480

同定した*C. trachomatis* のタンパク質との、*C. pneumoniae* の相同体から予想されるエピトープ

【 0 1 1 4 】

【 表 9 】

10

20

30

40

50

表VIII

タンパク質ID	位置	ペプチド配列	A 2 結合
CT149 (CPN0152)	274	FLGAAPAQM	17
CT149 (CPN0152)	237	FLGIQDHIL	29
CT149 (CPN0152)	101	LLTANGIAV	31
CT149 (CPN0152)	248	SLPRRIPVL	86
CT149 (CPN0152)	42	GLQEHCRCGV	107
CT149 (CPN0152)	160	SLGCHTTIH	170
CT149 (CPN0152)	307	ILTHFQSNL	181
CT149 (CPN0152)	52	VLSCGYNLV	202
CT149 (CPN0152)	195	LLKEICATI	248
CT149 (CPN0152)	272	RLFLGAAPA	318
CT149 (CPN0152)	141	ATVAKYPEV	338
CT149 (CPN0152)	11	LLSGSGFAA	343
CT149 (CPN0152)	102	LTANGIAVA	373
CT149 (CPN0152)	15	SGFAAPVEV	397
CT500 (CPN0619)	64	FMISGPVVV	20
CT500 (CPN0619)	103	ALFGESIGV	121
CT500 (CPN0619)	119	SLENAAIEV	212
CT500 (CPN0619)	87	LMGATNPKE	313
CT500 (CPN0619)	31	RIAAMKMHV	385
CT671 (CPN0705)	102	ALVETPMAV	13
CT671 (CPN0705)	167	FCGANLTLV	49
CT671 (CPN0705)	214	SLKARQLNL	151
CT671 (CPN0705)	193	QLTEATQLV	239
CT671 (CPN0705)	127	DLQWVEQLV	403
CT671 (CPN0705)	155	IVLDNSNTV	423
CT841 (CPN0998)	22	LLFGVIFGV	9
CT841 (CPN0998)	415	LLAKGQNKV	14

10

20

30

40

CT841 (CPN0998)	378	FTFMPILV	29
CT841 (CPN0998)	753	FLGDVSSGA	43
CT841 (CPN0998)	824	LLDAAYQRA	66
CT841 (CPN0998)	780	GMSDHLGTV	110
CT841 (CPN0998)	716	SLGATHFLP	124
CT841 (CPN0998)	170	NLAALNRV	153
CT841 (CPN0998)	376	YLFTFMPII	160
CT841 (CPN0998)	15	FPTAFFLL	167
CT841 (CPN0998)	566	ILMAATNRP	236
CT841 (CPN0998)	66	KTALNDNLV	244
CT841 (CPN0998)	638	LLNEAALLA	254
CT841 (CPN0998)	735	ELYDQLAVL	256
CT841 (CPN0998)	318	ALEKQDPEV	264
CT841 (CPN0998)	453	SLGGRIPKG	303
CT841 (CPN0998)	380	FMPIILVLL	314
CT841 (CPN0998)	644	LLAARKDRT	315
CT841 (CPN0998)	423	VTFADVAGI	427
CT841 (CPN0998)	142	YTISPRTDV	467
CT841 (CPN0998)	464	LIGAPGTGK	495

10

20

30

同定した*C. pneumoniae* のタンパク質との、*C. trachomatis* の相同体から予想されるエピトープ

## 【0115】

ペプチドエピトープは融合タンパク質の一部であるか、あるいは担体成分に結合しているか。

## 【0116】

MHCに結合するペプチドを予想するために頻繁に使用される方法は、モチーフ検索に関するものである。最も精巧なモチーフ検索は、MHCの広がったモチーフを表す完全な母型を使用する。配列と無関係な組合せの特異性は、平均的考慮事項として適切である可能性はあるが、個々のペプチドには適切でないことは確かに知られている。さらに、結晶構造によって、1つのサブサイトでの相互作用が、他のサブサイトでの相互作用に影響を及ぼす可能性があることが実証されている。

40

## 【0117】

人工神経回路網 (ANN) は、任意のこのような非線状配列の情報を取り扱い認識するのに非常に適している。情報を調整して、重み付けられた関係によってある構造中ですべてが結びついている入力層、隠れ層及び出力層を有するコンピュータ網に、分配することができる。このようなANNを調整して、所定の出力 (たとえばMHC結合) と関連がある

50

入力（ペプチド）を認識することができる。ひとたび調整されるとこの網は、結合と適合性がある複雑なペプチドのパターンを認識するはずである。ANN手法を使用すると、調整した組のサイズ及び質は非常に重要になる。これはHLAに関して特に当てはまる。なぜなら、わずか1%のランダムなペプチドの組が、任意の所定のHLAに結合するからである。

**【0118】**

したがって、わずか100例のペプチド結合体を生成するためには、ランダムなペプチドをスクリーニングする場合、約10,000個のペプチドの合成及び試験が必要であると思われる。これは非常な供給源を必要とし、調整した組のこの適度な数の結合体においてさえも面倒な事柄であり、さらにこのことは、試験するそれぞれのHLAに関して繰り返さなければならないと思われる。

10

**【0119】**

したがって、本発明に関しては、母型の予想を使用して、高い親和性で結合する可能性があるエピトープに関する、SWISS-PROT (<http://www.expasy.ch/sprot/>)のデータベースをスキャンした。これらの多数は、生化学的な結合アッセイにおいて合成され試験されてきている。予想されたように、高い親和性の結合体のより高い提示が得られた（約80%）。これらのデータを次いで使用して、ANNを調整した。

**【0120】**

試験した4つのMHCクラスI分子の4つに関して、母型適合型の断定より優れたANNを実施した。予想は、「結合体」と「非結合体」の随意の分類ではなく、実際の結合IC50値を予想する方式で行った。実際、広範囲の結合体を予想することが可能であり、これが高い親和性の結合体、及び低い親和性の結合体、及び非結合体の同定につながっている。

20

**【0121】**

本発明は、ワクチンを調製するための本発明のペプチドエピトープの使用、及び本発明のペプチドエピトープを含み、許容可能な賦形剤を場合によっては含むワクチンをさらに含む。

**【0122】**

本発明の他の態様では、本発明は、クラミジア感染などの細胞内細菌による感染を治療又は予防するための薬剤組成物の調製における、又は代替的には、クラミジアなどの細胞内細菌、又は細胞内細菌に対して産生された抗体の存在を検出するための診断試薬の調製における、本発明のタンパク質、本発明の抗体、本発明の核酸化合物、又は本発明のペプチドエピトープの使用に関する。

30

**【0123】**

本発明は、ヒトの免疫応答を誘導する方法であって、免疫学的に有効な量の本発明のタンパク質、抗体、核酸化合物、又はペプチドエピトープを前記ヒトに投与することを含む方法、特にC. pneumoniae又はC. trachomatisなどの細胞内細菌によるヒトの感染を治療又は予防するための、そのような方法をさらに提供する。

**【0124】**

最後に本発明は、本発明のタンパク質又はその断片、又は本発明のペプチドエピトープをそれぞれ生成させる方法であって、前記タンパク質又はペプチドエピトープをコードする核酸化合物を含むベクターを用いて、宿主細胞を形質転換、トランスフェクト、又は感染させること、及び宿主細胞による前記タンパク質又はその断片の発現を可能にする条件下で、宿主細胞を培養することを含む方法を提供する。

40

**【0125】**

以下の非制限的な実施例によって、本発明をさらに例示する。

**【実施例1】****【0126】**

哺乳動物細胞培養物の感染

50

半集密的 HeLa、HEp2、又は McCoy (ATCC、Rockville、MD、USA) の細胞単層を、[19.] 及び [17.] において前に記載されたように、C. pneumoniae VR1310、C. trachomatis 亜型 A (HAR-13)、D (UW-3/Cx) 又は L2. (434/Bu) (ATCC) の、1つの封入体形成単位 (IFU) を用いて感染させた。感染培地は、C. trachomatis A 及び D に関しては、RPMI 1640、25 mM の HEPES、10% FCS、1% w/v のグルタミン、10 mg/ml のゲンタマイシン、C. trachomatis L2. に関しては、RPMI 1640、25 mM の HEPES、5% FCS、1% w/v のグルタミン、10 mg/ml のゲンタマイシンからなっていた。

#### 【実施例 2】

10

##### 【0127】

#### パルス標識 / 追跡

クラミジアのタンパク質を 2 時間で標識するために、前に記載されたように (Shaw 他、1999、2000) [18.] [19.]、RPMI 1640、10 mg/ml のゲンタマイシン、40 µg/ml のシクロヘキシミド、100 µCi/ml の [35S]-メチオニン/システイン (Promix、Amersham Pharmacia Biotech、Uppsala、Sweden) を含む培地において、感染細胞の培養物をインキュベートした。標識後に、標識培地を正常な増殖培地に変え、次に増殖培地で 2 回洗浄し、標識後の異なる時点で感染細胞を採取した。同様に、2 時間の標識時間後に感染後 72 時間までクラミジアを増殖させることによって、標識した EB タンパク質を得た。次いで標識した EB タンパク質を採取し、C. trachomatis (Schacter and Wyrick、1994 中) [22.]、及び C. pneumoniae (Knudsen 他、1999 [17.]) に関して本質的に記載された、密度勾配超遠心分離法の 2 つの連続ステップを使用して精製した。EB 調製物及びパルス追跡調製物中のタンパク質は、全細胞溶解物の調製物からのタンパク質と同じ間隔で標識して、正確な二次元 PAGE によるタンパク質プロファイルの比較を容易にした。

20

#### 【実施例 3】

##### 【0128】

#### サンプル調製

[35S]-標識後に、PBS 中で細胞を 2 回洗浄し、9 M の尿素、4% w/v の 3-[ (3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニウム]-1-プロパンスルホン酸 (CHAPS; Roche、Germany)、40 mM の Tris Base、65 mM の DTE、及び Pharmalyte 3~10 (Amersham Pharmacia Biotech) を含む、標準溶解バッファー中に溶かした。高分子量で疎水性であるタンパク質を濃縮するために、7 M の尿素、2 M のチオ尿素、4% w/v の 3-[ (3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニウム]-1-プロパンスルホン酸 (CHAPS; Boehringer Mannheim、Germany)、40 mM の Tris Base、65 mM のジチオエリトール (DTE)、及び 2% vol/vol の Pharmalyte 3~10 (Amersham Pharmacia Biotech) を、(Harder 他、1999 [23.]) に本質的に従って使用した。全細胞溶解物又は精製した EB を含むサンプルを超音波処理し、10000 × g で 10 分間遠心分離にかけた。サンプルは、使用するまで -70 °C で保存した。

30

40

#### 【実施例 4】

##### 【0129】

#### クラミジアのタンパク質の分離

全細胞溶解物及び精製した EB からのクラミジアのタンパク質を、(Shaw 他、1999、2000) [18.] [19.] 中に本質的に記載された、2次元ゲル電気泳動によって分離した。

##### 【0130】

第 1 次元の等電点 (pI) 電気泳動に関しては、18 cm 長の pH 3~10 NL (非線状

50

)、4~7 L (線状)又は6~11 (線状)固定化pH勾配乾燥細片 (Amersham Pharmacia Biotech)を、IP Gphor (商標)を使用して20で12時間、200,000計数毎分 (cpm)の標識タンパク質を350  $\mu$ lのバッファに溶かしたサンプル量で再膨潤させた。本発明で使用した他の細片は、超細型IPG細片を含む。これらの細片は表IXに記載する。これらの細片によって我々は、必要な場合、当該のタンパク質を含めて、特定のpH間隔に焦点を当てることができる。20における等電点 (pI) 電気泳動中の電圧は、以下のようにプログラム化した: 3~10 NL、4~7 L及び6~11 L乾燥細片を使用するとき、300 Vで1時間、300~500 Vで2時間 (直線的増加)、1000 Vで1時間、2000 Vで1時間、3500 Vで3時間及び5000 Vで24時間。

10

【0131】

【表10】

表IX:

IPG細片の名称	線型性	含まれるpH間隔	細片の長さ
Immobiline Drystrip pH 3-10	非線状	3-10	18 cm
Immobiline Drystrip pH 3-10	線状	3-10	18 cm
Immobiline Drystrip pH 4-7	線状	4-7	18 cm
Immobiline Drystrip pH 6-11	線状	6-11	18 cm
Immobiline Drystrip pH 6-9	線状	6-9	18 cm
Immobiline Drystrip pH 3.5 -4.5	線状	3.5 -4.5	18 cm
Immobiline Drystrip pH 4-5	線状	4-5	18 cm
Immobiline Drystrip pH 4.5-5.5	線状	4.5-5.5	18 cm
Immobiline Drystrip pH 5-6	線状	5-6	18 cm
Immobiline Drystrip pH 5.5 -6.7	線状	5.5 -6.7	18 cm

20

30

本発明において有用な、市販のIPG乾燥細片の例の一覧表

【0132】

第1次元の等電点 (pI) 電気泳動の後に、6 Mの尿素、30% v/vのグリセロール、2% w/vのDTE、2% w/vのSDS、0.05 MのTris HCl pH 6.8を含むバッファ中で15分間、乾燥細片を平衡状態にした。次いでこれらの細片を、DTEを2.5% w/vのヨードアセトアミドに交換したバッファ中で、さらに15分間平衡状態にした。第2次元の等電点 (pI) 電気泳動に関しては、Protean Ixi Multicell system (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)を使用して、9~16%直線勾配SDS-PAGEゲル (18 cm x 20 cm x 1 mm) 上でタンパク質を分離した。分析ゲルは、10%酢酸及び25%2-プロパノールを含む溶液に30分間固定し、Amplify (Amersham Pharmacia Biotech)を用いて30分間処理した。標識タンパク質は、-70でKodak Biomax-MRフィルム (Amersham Pharmacia Bio

40

50

t e c h ) を感光させた 8 ~ 10 日後に、オートラジオグラフィーによって目に見える状態にした。

#### 【0133】

図 1 A は、感染後 22 ~ 24 時間から標識した *C. trachomatis* D のタンパク質の、高解像度分析した 3 ~ 10 I P G 二次元ゲル (標準溶解バッファーを使用した) のオートラジオグラフィーの一例を示す。図 2 A は、感染後 55 ~ 57 時間から標識した *C. pneumoniae* のタンパク質の、3 ~ 10 I P G 二次元ゲル (チオ尿素を含む溶解バッファーを使用した) のオートラジオグラフィーの一例を示す。Melanie II ソフトウェアによって評価されたように、合計約 600 個のタンパク質スポットを、それぞれのゲル上で可視化することができた。

10

#### 【0134】

質量分析法による分析用にサンプルを調製するために、二次元ゲルに 500 ~ 1000  $\mu$ g の全細胞溶解物を施した。X 線フィルム上の調製用ゲル上でタンパク質を可視化するために、非標識サンプルと平行して増殖させた細胞からの、 $2 \times 10^6$  c p m の [35S] - タンパク質標識タンパク質を、同じゲル上に施した。調製用ゲルを ddH<sub>2</sub>O 中で 10 分間洗浄し、乾燥させ非固定状態にした。乾燥ゲルと対応する X 線フィルムの正確な整合を感光後に行うことができるように、放射性インクを使用してゲルの両側のアンカースポットに印を付けた。当該のタンパク質を、最小である 3 つの同一のゲルから切除し 1 つに集めた。宿主細胞の汚染が質量分析法による同定において問題であった場合、細型又は超細型乾燥細片 (表 IX) を使用したゲルを使用して、分離距離を増大させた。

20

#### 【実施例 5】

#### 【0135】

MALDI MS、ESI Q - TOF MS、PSD - MALDI MS 及び Edman 分解を使用する、ワクチン候補の同定  
ワクチン候補を表す全細胞溶解物の調製用ゲルからのタンパク質スポットに、トリプシンによるゲル内の消化を施した。生成したペプチドは、逆層カラム (Gobom 他、1999 [20.]) 又は Poros R2 物質からなるビーズ (Gevaert 他、1997 [21.]) を使用して精製した。次にサンプルを、リフレクトロン方式で操作される、Bruker REFLEX MALDI 飛行時間質量分析計 (Bruker - Daltonik, GmbH, Bremen, Germany) を使用して分析した。生じた質量  
を、以前に記載した (Schevchenko 1996 [24.]) ペプチドマッピングによって、データベース中の存在するタンパク質の理論上のトリプシン切断によって生じるペプチドの質量と比較した。

30

#### 【0136】

MALDI - MS を使用して、DT1 を CT668 として同定する一例を図 3 に示す。図 3 A は、MALDI 質量分析計によって得られた、ペプチド質量のフィンガープリントを示す。得られた質量は、Prospector ソフトウェア MS - Fit を使用して、データベース中の存在するすべてのタンパク質の、理論上のトリプシン切断による生成物と整合させた。検索がゲル上に見られるタンパク質近辺の等電点 (pI) / 分子量 (Mw) 領域に制限される場合、最高位のタンパク質が CT668 であった (図 3 B)。しかしながら、宿主細胞からのタンパク質が時折ゲル及び全細胞溶解物からのスポット中に存在するので、同定は明白である可能性がある。したがって、必要な場合は、タンデム質量分析及びポストソース分解 (PSD) 分析を使用して、結果を立証した (Mann and  
Wilm, 1995 [25.], Gevaert, 1997 [21.]) 中に概説されている)。

40

#### 【0137】

ゲル内での消化によって生じたペプチドのタンデム質量分析は、エレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間 (ESI Q - TOF) 質量分析計 (Micromass, Manchester, UK) で行った。この方法を使用して、1 つのイオン化したペプチドを、サンプルから単離することができる。気体雰囲気との衝突によるこの親イオンの断片化に

50

よって、いくつかの新しいイオンが生成し、新しいペプチド質量のフィンガープリントに記録された。これらの新しいイオンはただ1つのアミノ酸によってサイズを区別し、これによって元のペプチドのアミノ酸配列の詳細が得られた (Mann and Wilm, 1995) [25.]。

【0138】

図4Aは、BLAST又はMS-Tagを使用するデータベース検索によってCT668の断片に対応することが見出された配列を与える、DT1からの断片化ペプチドの親イオンの一例を示す。ヒトのプロゲストロン結合タンパク質から生じる配列タグも、CT668サンプルから同定した。

【0139】

検索がヒトのタンパク質に制限される場合、このタンパク質からのペプチドも、MALDI-MSによるペプチド質量のフィンガープリントにおいて検出することができると思われる (二重矢印、図3A)。これによって、2つ以上のタンパク質を含む問題のあるスポットを、ESI-Q-TOFによって明白に同定することができ、したがって問題のあるMALDI-MS同定が確認されることが示される。

【0140】

MALDIの結果を確認するために本発明において使用する他の手法は、PSDであった。PSDは、イオン化の後に準安定状態での分解を受けたペプチドを使用し、同じ速度のペプチド断片は異なる質量を有し、したがって異なる運動エネルギーを有することが意味される。運動エネルギーの違いは、断片を磁場で示すことによって解明することができる。高エネルギー断片は、低エネルギー断片よりも磁場にさらに浸透し、したがって遅延する。1つのペプチドの細分化から生じるスペクトルを使用して、ペプチド配列タグ (PST) のアミノ酸配列を推定することができる (Mann他、1993) [28.]。なぜなら、断片化はペプチド結合において主に起こるからである。PSTはタンパク質のデータベースに対して整合させることができ、したがって、それらが由来するタンパク質を同定することができる (Wilkins他、1996 [27.] )。

【0141】

PSD-MALDI-MSによって、スポット番号CP63をCPN1016として同定する一例を、図4Bに示す。PSDスペクトル中の合計36の観察した質量体から16個を、C.pneumoniaeからのCPN1016タンパク質と整合した、1919.80Daの親イオン (R) ELLFGWDL SQQTQQA R (L) という配列を有する、ペプチドの理論的断片化に由来する質量体に、1質量単位内で整合させることができた。

【0142】

質量分析による手法を使用して、C.trachomatis D (表III A) 及びC.pneumoniae (表III b) のワクチン候補の同定の例が与えられる。分子量 (Mw) 及び等電点 (pI) の値は、電気泳動によって+/-10%の平均誤差で決定した。

【0143】

CT858は67kDaという理論上の分子量 (Mw) を有しており、これによって同定されたこのタンパク質は、より大きなタンパク質のプロセッシングされた断片であったことが示される。実際、DT4のESI-Q-TOF分析からの3つのペプチドすべてが、タンパク質のC末端部分に位置していた。

【0144】

ゲルの塩基性領域中に位置していた他のスポット、DT48もCT858を含んでいた。DT48がCT858として同定された、すべてのペプチドが、タンパク質のN末端部分と整合しており、DT48がCT858のN末端断片を表すことが示唆される。

【0145】

CT610は、C.trachomatis DとL2の両方において、MALDI-MS及びEdman分解によって、EBから同定された。しかしながら、タンパク質は全細

10

20

30

40

50

胞溶解物と比較してEB中では大幅に低下しており、したがってワクチンの候補であると依然としてみなされた。Edman分解によるCT610の同定は、*C. trachomatis* L2 CT610から行った。そのN末端はMNF LDQであると決定し、これは*Chlamydia Genome*プロジェクト(Stephens他、1998b) [35.]から予想された、MMEVF MNFLDQ配列とは異なる。

#### 【0146】

E SI T O F M Sによって生成した4つの配列タグに基づいて、DT8を同定した。これらの配列は、*C. trachomatis* Dのゲノム中の、いかなる予想されたオープンリーディングフレームにも対応しなかった[35.]。しかしながら、BLASTによって6つすべてのリーディングフレーム中のクラミジアのゲノムを検索することによって、4つすべての配列タグに関して相当な整合性を生み出すことができると思われる。ペプチドをコードするDNA配列、及びその周辺を分析することによって、7.2 kDaのタンパク質を含む、リボゾーム結合部位を含む新規なオープンリーディングフレームが解明された。翻訳されたDT8のDNA配列を、図5に示す。この発見によって、どのようにして本発明で使用した質量分析手法が、大きなゲノム配列決定プロジェクトでは無視される可能性がある、ワクチン候補をコードするおそらく重要なORFを同定することができるかが例証される。

10

#### 【0147】

*C. pneumoniae*からのスポットCP63は、CPN1016、CT858の*C. pneumoniae*相同体のN末端断片として同定し(図2B及びC、表IIIB)

20

#### 【0148】

以下の実施例では、同定したタンパク質のいくつかの例の性質の、より詳細な調査を示す。

#### 【実施例6】

#### 【0149】

感染細胞の全溶解物と精製したRBの比較

*C. trachomatis*又は*C. pneumoniae*に感染した細胞を、実施例2に記載したように、シクロヘキシミドの存在下で2時間、[35S]-メチオニン/システインで標識した。標識時間の終わりに感染細胞を、実施例3に記載したように溶解バッファ中で直接採取した、あるいはクラミジアのRBをすぐに精製するために使用した。RBの精製は、Schacter and Wyrick、1994 [22.]によって本質的に記載された、密度勾配超遠心分離法によって行った。

30

#### 【0150】

図10では、感染後22~24時間から標識した感染HeLa細胞の全溶解物からの、*C. trachomatis* Dのタンパク質のゲル画像からの領域のいくつかの例を、感染後22~24時間から標識した*C. trachomatis* Dに感染したHeLa細胞から精製した、RB及びEBのゲル画像からの対応する領域と比較する。質量分析による同定を、表IIIに挙げた、DT4(CT858のC末端断片)、DT48(CT858のN末端断片)、DT23(Mip)、DT76(仮想タンパク質CT691)及びDT77(仮想タンパク質CT263)に関して行った。

40

#### 【0151】

図11では、感染後55~57時間で標識した*C. pneumoniae*に感染したHEp-2細胞のゲル画像、及び発生サイクル中の時点で標識した精製EBからのゲル画像からの領域のいくつかの例を、感染後34~36時間で標識したか、あるいは感染後36時間で感染細胞の全溶解物として採取したか、あるいは感染後36時間でRBとして精製した、*C. pneumoniae*に感染した細胞の培養物の画像からの対応する領域と比較する。

#### 【0152】

図11で円で囲んだタンパク質スポットは、以下のように同定した。図11A及びEは、

50

CPN1016の2つの断片として同定した、CP34及びCP63を示す。図11Bは、CPN0998として同定した、CP37を示す。図11Cは、それぞれCPN0796及びCPN0705として同定した、CP46及びCP47を示す。図11Dは、CPN0152として同定した、CP52を示す。図11Fは、CPN0619として同定した、CP75を示す。

【実施例7】

【0153】

III型分泌遺伝子亜群中に位置するタンパク質の検出及び同定

大部分の細胞内細菌のIII型分泌遺伝子は、1つの遺伝子群中に病原性細胞群として位置するが、クラミジアのIII型分泌遺伝子は、*C. trachomatis*と*C. pneumoniae*の両方では、ゲノム中の異なる場所に位置する、3つの異なる群中において同定されてきている(Stephens他、1998[4.]及びKalman他、1999[5.])。 *C. trachomatis* A、D及びL2、及び*C. pneumoniae* VR1310の包括的なプロテオミクス解析の一部として、III型分泌群中に存在したタンパク質を、精製したEBに関して行ったゲルから同定した。

10

【0154】

*C. trachomatis* から同定したIII型分泌タンパク質には、細菌の細胞質から分泌機構にタンパク質を輸送するのに必要な、Yop分泌ATPアーゼ(yscN)、Yop輸送担体タンパク質L(YscL)及び分泌シャペロン(SycE)がある。さらに、未知の機能を有するがIII型分泌亜群中に位置する、同定した*C. trachomatis* Dのタンパク質にはCT560、及び多量のCT577及びCT579がある。CT668は全細胞溶解物中には明らかに存在するが、精製したEBには存在せず、YscNの隣に位置するために、このタンパク質が分泌する可能性がある。タンパク質のゲノム位置は、図9に示す。

20

【0155】

*C. pneumoniae* に関しては、III型分泌器官からのタンパク質LcrE(CPN0324)、YscC(CPN0702)、YscN(CPN0707)及びYscL(CPN0826)が、同定されてきている。YscC(CP89図II、表II)は、おそらく封入体膜中の局在性のために精製したEBには存在せず、封入体膜ではYscCは宿主細胞の細胞質に曝されている。YscC(CPN0702)及びYscN(CPN0707)周辺に位置するIII型群中に存在する、2つのタンパク質を、精製したEBよりも全細胞溶解物中において著しく多い量で検出した。これらはCPN0705(CP90、図II、表II)及びCPN0711(CP76、図II、表II)であった。これらのタンパク質は封入体膜中に位置するか、全細胞溶解物中に存在する可能性もあり、いずれの場合もこれらのタンパク質は、プロテアソームの影響を受ける可能性がある。

30

【実施例8】

【0156】

分泌タンパク質の候補のパルス追跡実験

同定した候補タンパク質が感染細胞中に存在することができると思われる時間を評価するために、本発明は一連のパルス追跡実験を提供する。以下の実施例では、感染細胞の培養物を22~24時間から[35S]標識した。標識時間の後、[35S]-メチオニンを含まない通常のRPMI増殖培地に培地を変更し、標識後の異なる時間で細胞を採取した。いくつかの独立した実験からの結果によって、おそらく宿主細胞の濃度及び/又は感染の効率のわずかな違いによる、わずかな変化が示された。

40

【0157】

図1B、C、D及びEは、パルス/追跡実験の例を与える。CT668及びDT8(図1:それぞれA、B)の強度は、合成の1.5時間後に大幅に低下し、4.5時間で、EB段階までゲルにはほとんど存在しなかった。CT610及びCT783(図1:それぞれC、D)は有意に低下したが、4.5時間で、EB段階まで依然として検出可能であった。CT858(D)のC末端断片(及びCT858のN末端断片)は、最初の追跡時間中

50

に徐々に増加したが、EBには存在せず、クラミジアの発生中に切断産物が蓄積したことが示唆される。CT858の*C. pneumoniae*相同体のN末端断片、CPN1016もEBには存在しなかった(図2)。

【実施例9】

【0158】

プロテアソーム阻害剤と組み合わせたパルス追跡実験

この実施例は、プロテアソームでプロセッシングされるのはどのワクチン候補であるかの、決定の仕方を示す。細胞透過性であるプロテアソーム阻害剤を、標識及び追跡時間中に感染細胞の培養物に加え、タンパク質の代謝回転時間を、プロテアソーム阻害剤を加えない標識/追跡に関して観察したものと比較した。この手法の重要性の一例は、図6に示す。タンパク質は感染後22~24時間から、10~100 $\mu$ Mのプロテアソーム阻害剤MG-132の存在下又は不在下で標識した。次いで標識培地を、通常の増殖培地中で2回洗浄した後の、MG132を含むかあるいは含まない増殖培地に交換し、感染後24時間~感染後28時間で追跡した。細胞溶解物に二次元PAGE(IPG)を施し、MG-132を含まない対照、及び標識直後に採取したタンパク質を含むゲルと比較した(図6A、B及びC)。本発明は、プロテアソーム阻害剤を用いた処理のために増大した代謝回転時間を有した、15個の*C. trachomatis* Dのタンパク質を提供する。

10

【0159】

DT9、DT10及びDT11のレベルは、標識時間の直後に採取した対照中よりも、追跡+MG-132ゲル中で実際に高かった。これによって、DT9、DT10及びDT11が、プロテアソームによって非常に速く分解されることが示される。対照的に、プロテアソーム阻害剤を加えることによって、DT7のレベルが著しく影響を受けることはなかった。

20

【0160】

本発明は、プロテアソームの触媒活性の異なる部分を阻害する、いくつかの他のプロテアソーム阻害剤(たとえばMG115、MG262、PSI及びラクトシステイン)の使用を含み、これによってプロテアソームで分解される他のタンパク質を解明することができる(表IV)。

【実施例10】

【0161】

クラミジアタンパク質の代謝回転時間に対するプロテアソーム阻害剤の影響を調べるための、遺伝的に改変された細胞系の使用。

30

本発明は、市販のマウス胚細胞系MEC-PA28、細胞系PW8875の使用も提供する。MEC-PA28はプロテアソームのIFN-誘導性PA28及びサブユニットでトランスフェクトし、MEC217細胞系はプロテアソームのIFN-誘導性LMP2、LPM7、及びMECLでトランスフェクトする。MEC-PA28及びMEC217を半集合状態まで増殖させ、*C. trachomatis*又は*C. pneumoniae*で感染させる。プロテアソームのサブユニットでトランスフェクトしていない、対照のマウス胚細胞系を平行して感染させた。

40

【0162】

細胞系MEC-PA28及びMEC217から過剰発現されたサブユニットをコードするトランスフェクト遺伝子は、MHCクラスI抗原のプロセッシング及び提示に必要なので、パルス標識/追跡と組み合わせたプロテアソーム阻害剤を使用する実験手順を、前述のようにこれらの宿主細胞を用いて行う。

【実施例11】

【0163】

ワクチン候補をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)のクローニング及び発現

ワクチン候補をコードするORFのクローニング及び発現を、製造者の教示書に従ってPET-30LIC Vector Kit(Novagen, Madison, USA)

50

を使用して行った。

【0164】

遺伝子のPCR用に使用したプライマーは、以下の5'端及び3'端LIC突出部を有していた：

正方向プライマー：5' G A C G A C G A C A A G A T X - 遺伝子特異的配列3'

逆方向プライマー：5' G A G G A G A A G C C C G G T - 遺伝子特異的配列3'

(X：挿入用特異的配列の第1のヌクレオチド)

【0165】

完全長の遺伝子又はリーダー配列を含まない遺伝子を、Expand (商標) High Fidelity PCR (Roche, Germany) を使用するPCRによって増幅させた。35のPCRサイクルを、DNA Thermal Cycler (Gene Amp PCR system 9600, Perkin Elmer) で以下のように行った：92 で15秒間(変性)、55 で15秒間(プライマーアニーリング)及び68 で4分間(伸長)。生成したPCR産物は、遺伝子特異的配列の近くにLIC突出部を含んでいた。PCR産物は、精製されたWizard (Promega, Madison, USA) であり、pET-30ベクターに連結させた。pET-30ベクターは、カナマイシン耐性をコードする遺伝子、及びLICクロニング部位の上流のヒスチジンタグを含む。

【0166】

候補遺伝子を含むpET-30ベクターを、コンピテント大腸菌Nova Blue 菌株に形質転換した。コロニーはカナマイシンアガープレート上で選択し、選択したコロニーに関する対照PCRは、ベクター特異的プライマー及び挿入用特異的プライマーを使用して行った。プラスミドDNAは、候補遺伝子に特異的な挿入体を含む陽性コロニーから精製した。次にプラスミドDNAを、大腸菌(BL21)に形質転換した。挿入陽性コロニーを、カナマイシンアガープレート上で選択した。N末端に位置するヒスチジンタグを含む遺伝子特異的挿入体を含む、融合タンパク質の発現は、1mMのIPTG (Apollo Scientific, GB) を加えることによって、500mlのLB培地中で誘導した。

【0167】

C. trachomatis DからのCT668、CT858、CT783、CT610、YscN及びDT8、及びC. pneumoniae VR1310からのCPN1016及びYscCの、組換え融合タンパク質を発現する大腸菌(BL21)を生成させた。

【0168】

組換え融合タンパク質は、ニッケル樹脂カラム(High Trap Sepharose, Amersham Pharmacia Biotech) を使用して、前に記載したように、溶解した細菌から精製した。精製したタンパク質の、クーマシー染色したSDS-PAGEゲルを施した。融合タンパク質を表すクーマシー染色されたバンドを、MALDI MSによって明白に同定して、正確な融合タンパク質が生成されたことを確認した。ポリクローナル抗体を含む血清を、Knudsen他によって[17]に記載されたように、50µgの融合タンパク質をフロイトのアジュバントに溶かしたものを3回筋肉内注射し、50µgの融合タンパク質をPBSに溶かしたものを2回静脈内注射し、ニュージーランド白ウサギを免疫処置することによって得た。

【実施例12】

【0169】

ワクチン候補に対するPAbを使用するウエスタンブロッティング  
PAbが正しいワクチン候補を確認したことを確認するため、考えられる翻訳後の改変又はプロセッシングを可視化するために、二次元PAGE免疫プロット法を行った。全細胞溶解物からの、500µgの非標識、及び $2 \times 10^6$  cpmの標識したC. trachomatis D又はC. pneumoniaeのタンパク質を二次元PAGEによって分

離し、タンパク質はP V D F膜上にエレクトロブロットングした。150 mMのNaCl (又は高級塩の形、400 mM)、20 mMのTris、0.2% w/vのゼラチン、0.05% v/vのTween 20 (Bio-Rad)及び2% v/vの正常なヤギ血清 (Dako、Glostrup Denmark)を含むバッファー中にPA bを溶かした、1/500~1/1000希釈物を使用して、免疫染色を行った。

#### 【0170】

使用した二次抗体は、抗体バッファーに1/2000で希釈した、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギIgG (Bio-Rad)であった。プロット試料は、明確な反応が検出されるまで、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸トルイジン (BCIP) / ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) (Bio-Rad) で染色した。免疫プロット試料をコンピュータでスキャンし、次にX線フィルムに約8日間曝した。Melanie II Softwareを使用して、免疫染色されたタンパク質を、[35S] 標識したそれらの相当物と比較した。

10

#### 【0171】

図7A1及び7A2では、CT858に対するPA b 245に関する、二次元PAGE I M B画像全体の例を示す。PA b 245は、対応する標識されたバックグラウンドから示されるように (図7A2)、DT4 (CT858のC末端断片) 及びDT48 (CT858のN末端断片) と再現的に反応する (図7A1)。

#### 【0172】

図7B1及び7B4は、CT668及びYscNに関するI M Bを示す。ゲル上の免疫反応性があるタンパク質スポット、及び標識されたバックグラウンド (図7B2及びB5) に基づくそれらの局在性は、分析ゲル上のタンパク質の位置に対応し (図7B3及びB6)、したがってPA bが正しいタンパク質と反応したことが確認された。

20

#### 【0173】

本発明は、いくつかのイソ型のCT610のレベルが、未処理の対照と比較して、MG132で処理した感染細胞において明らかに増大することを示す、I M Bの例を提供する。DT7はCT610として同定し、これはDT9、DT10、DT11及びDT12の真上に位置していた (図6A)。全細胞溶解物の二次元ゲルプロット試料上で (図7C1)、CT610に対するPA b 255を用いるI M Bは2列のスポット、DT7を表す1列、DT9、DT10、DT11及びDT12を表す他の1列と明らかに反応した。したがってCT610は、おそらく翻訳後の改変又はプロセッシングが異なるために、異なるイソ型中に存在する。細胞をプロテアソーム阻害剤MG132で処理した場合、DT9、DT10及びDT11の量は明らかに増大した (図7C2)。

30

#### 【0174】

PA b 255を用いるI M Bを、MG132の存在下及び不在下でそれぞれ6時間処理した全細胞溶解物からのタンパク質を含む、通常のSDS-PAGE P V D Fプロット試料に行った。図7C4は、未処理の対照 (レーンa及びc) と比較した、MG132処理した感染細胞からのタンパク質を含むレーン (レーンb及びd) 中の、DT7列のスポットを表すバンドの下の、追加的バンドを明らかに示す。DT7列を表す上側バンドのレベルは、プロテアソーム阻害剤による処理によって著しく変わることはなかった。

40

#### 【実施例13】

#### 【0175】

異なる宿主細胞中での増殖時の、異なる亜型のC. trachomatisの候補の発現本発明は、分泌されている可能性があるタンパク質の発現レベルの、亜型/宿主細胞特異的な違いを考慮する。なぜなら、宿主細胞/クラミジアの相互作用は、他の亜型に関して、あるいは他の宿主細胞中での培養によって、異なる可能性があるからである。このことは、一般的なC. trachomatisワクチン用の可能性が最も高い、ワクチン候補の選択と関連がある。

#### 【0176】

CT668、CT858、CT783及びCT610はすべて、C. trachomat

50

is A、D及びL2の同じ位置で検出した。このことは、C. trachomatis DとL2の間のこれらのタンパク質をコードする遺伝子が、非常に保存されていることと一致する。さらに、C. trachomatis A、D及びL2をHeLa細胞ではなくMcCoy又はHep-2細胞中で培養すると、これらすべてのタンパク質が発現され、これらのタンパク質の発現は、使用する細胞のタイプとは無関係であることが示された。しかしながら、感染後22~24時間又は感染後34~36時間から標識したクラミジアのタンパク質を含むゲルに基づくと、亜型A及びDにおいて、DT8は等電点(pI)5.1及び分子量(Mw)7.5で検出可能であった。しかしながら、亜型L2では、タンパク質の純粋な電荷及び等電点(pI)を変えるわずかなアミノ酸の置換のためにおそらく、DT8は等電点(pI)6.4及び分子量(Mw)7.5で検出された。

10

#### 【実施例14】

##### 【0177】

ワクチン候補の間接的な免疫蛍光顕微鏡検査

半集密的HeLa細胞の単層を含む、ウエル及びガラスカバー片を、C. pneumoniae又はC. trachomatis Dで感染させた。約50%の細胞のみが感染するように、力価の低いクラミジアを使用し、これによって感染した細胞と感染しなかった細胞を明らかに区別することができた。細胞はPBS中で2回洗浄し、感染後の異なる時間にホルムアルデヒド又はメタノール中で固定し、間接的な免疫蛍光顕微鏡検査を施した。必要な場合は、アセトン沈降HeLaタンパク質によってPAbを事前に吸着させて、ヒトタンパク質との最小限の交差反応を得た。

20

##### 【0178】

図8に示す例では、事前に吸着させたウサギPAbの1/200希釈物、及びC. trachomatis MOMP(MAb32.3)を対象とするマウスモノクローナル抗体又はC. pneumoniaeに対するMAb18.3の1/25希釈物を使用した。フルオレセインイソチオシアネート結合型(FITC)ヤギ抗ウサギ(GAR)IgG抗体、及びローダミン結合型ヤギ抗マウス(GAM)IgG抗体(Jackson、Trichem、Denmark)を、二次抗体として使用した。二重の免疫染色を行って、クラミジア封入体に対するワクチン候補の亜細胞レベルの局在性を決定した。

##### 【0179】

短い代謝回転時間を有していたDT8を対象とするPAb249は、クラミジア封入体中のRBとわずかに反応した(図8A3)。HeLa細胞のタンパク質との交差反応が最小限であったにもかかわらず、封入体以外の宿主細胞構造に対する顕著な反応は、検出されなかった。

30

##### 【0180】

対照的にCT858は、感染細胞では宿主細胞の細胞質を明らかに染色したが、非感染細胞ではしなかった(図8B3)。一般に染色は、封入体の境界でより強かった。宿主細胞の細胞質の染色は、パルス追跡実験によって予想された長い代謝回転時間と一致して、感染後12時間~感染後72時間で可視化することができた。CT858の相同体であるC. pneumoniae CPN1016に対して産生されたPAbを、C. pneumoniaeで感染させたHep-2細胞と反応させると、同じ反応特性が観察された。

40

#### 【実施例15】

##### 【0181】

同定したタンパク質に関する実施例の説明

スポット番号CT668(DT1及びDT2)

CT668を、III型分泌遺伝子と相同性がある遺伝子を含み、予想された認識可能なシグナルペプチダーゼ切断部位は含まない、亜群の1つのYscN ATPアーゼのすぐ上流に置いた。CT668は、約4~6時間C. trachomatis D中のみに存在し、その間に量が確実に減少した。CT668のみに対するPAbは、IMFの封入体中のRBとわずかに反応するようであるが、このタンパク質の短い代謝回転時間を考慮すると、宿主細胞中での迅速な分解によって、これを説明することができる。CT668は

50

感染後 12 ~ 40 時間から検出され、これによってこのタンパク質が、細胞内分化の大部分中に生成されることが示唆される。したがって、*C. trachomatis* は CT 668 を連続的に宿主細胞に運び、CT 668 はそこで機能を果たし、すぐに分解される可能性がある。

**【0182】**

CT 668 の 2 つの変異体を同定した。塩基性変異体が、感染後 22 ~ 24 時間から標識し次に採取した *C. trachomatis* のタンパク質を含むゲル上に最も多量に存在した。興味深いことに、行ったすべての研究において時間と共に、酸性変異体の強度は増大し、塩基性変異体の強度は低下した。CT 668 を 30 分間隔で追跡すると、酸性変異体の増大が 1 時間で既に検出可能であった (図 1 B)。

10

**【0183】**

この発見によって、変性は、カルバメート化又はアミド化などの変性を生み出す可能性がある、ゲルの施された条件によるものではないことを示唆することができる。そのかわりに変性は、タンパク質を変性させる未知の酵素にのみ原因があるようである。

**【0184】**

*C. psittacii* 中の分泌タンパク質の変性は記載されてきており、この場合 *IncA* が、封入体膜への転移の後に、宿主細胞の *Ser/Thr* キナーゼによってリン酸化される (Rockey 他、1997) [29.]。CT 668 の代謝回転時間はプロテアソーム阻害剤を用いた処理によって延長され、生成された少なくとも限られた量の CT 668 は、プロテアソームでプロセッシングされる可能性があることが示唆される。

20

**【実施例 16】****【0185】**

スポット番号 DT 8 (DT 8)

DT 8 は、相同性検索に基づいて *C. trachomatis* の特異的なタンパク質である、新規な 7.2 kDa のタンパク質である。P S O R T 分析によって、このタンパク質に関する認識可能なリーダー配列が存在しないことが示された。理論上の配位、等電点 (pI) 5.21 / 7.2 kDa は、実験によって決定されたものと非常に一致した。CT 668 に関して認められた多くの特徴が、DT 8 に関して観察された。6 時間未満の短い代謝回転時間を観察し、IMF は RB とごくわずかな反応を示した。

**【0186】**

DT 8 中の停止コドンの後ろに、Rho 非依存性のタンパク質の転写停止を示す、潜在的なステムループ領域を予想することができる。

30

**【実施例 17】****【0187】**

スポット番号 DT 7、DT 9、DT 10、DT 11、DT 12 (CT 610)

他の細菌中の分泌と関連がある遺伝子と相同性がある、いかなる遺伝子の近くにも、CT 610 は位置していなかった。このタンパク質は全細胞溶解物と EB の両方から同定されたが、Melanie I I Software によって、全細胞溶解物中において少なくとも 30 倍多いと評価された。このタンパク質は、CT 610 に対して産生された P a b 255 によって決定されたように、2 つの分子量 (Mw) の多形によって表されるいくつかのイソ型で検出された。これらのスポットの列によって、DT 7 (上列) 及び DT 9、10、11、12 (下列) が表された。この両方の列は、パルス追跡実験において短い代謝回転時間を有していた。興味深いことに、DT 9、DT 10 及び DT 11 の量は、パルス追跡 / M G 132 実験に基づくプロテアソーム阻害剤を用いた処理によって大幅に増大した。パルス追跡実験は、P a b 255 を用いる S D S P A G E I M B によって確認した。

40

**【0188】**

したがって本発明は、CT 610 のいくつかのイソ型が分泌され、プロテアソームでプロセッシングされる証拠を提供する。CT 610 イソ型の異なる結末は、ワクチン候補に対して産生された P a b を使用してこのようなイソ型を検出することの妥当性を示す。

50

## 【実施例 18】

## 【0189】

スポット番号 DT3 (CT783)

CT783は、*C. trachomatis*のタンパク質ジスルフィド結合イソメラーゼであることが示唆されてきている。CT783は、チオレドキシンジスルフィドイソメラーゼ (CT780)、及び *Methanobacterium thermoautotrophicum*からのタンパク質ジスルフィドイソメラーゼと相同性を示す。33のアミノ酸リーダー配列をPSORT及びSignalPによって予想することができ、切断されたタンパク質の理論上の等電点 (pI) 及び分子量 (Mw) は、実験によって決定されたものと一致した。さらに、CT783に対して産生されたポリクローナル抗体は、4 ~ 7 LIPGを使用する二次元PAGE IMBにおいて正確なスポットを染色した。

10

## 【0190】

N末端リーダー配列の切断のために、おそらくこのタンパク質がI型又はIII型の系によって分泌されることはないが、II型の系によって分泌される可能性が高い。わずかなPSORT予想によって細菌内の膜中の亜細胞レベルの局在性が示唆されたが、大部分のPDIは正常では周辺質に位置している。CT783は非常に短い代謝回転時間を有しており、合成後の約4~6時間の追跡の後には、クラミジア中にはほとんど存在しない。

## 【0191】

CT783の代謝回転時間はプロテアソーム阻害剤によって延長され、プロテアソームの潜在的なプロセッシングが示唆された。

20

## 【実施例 19】

## 【0192】

スポット番号 DT4 及び DT48 (CT858) 及び CP63 (CPN1016)

CT858は切断性のN末端リーダー配列を有しており、これは67kDaの周辺質のタンパク質であると予想されたが、ゲル上の2箇所の異なる位置で同定された。DT4をCT858として同定した配列タグはすべて、CT858のC末端部分と整合した。全細胞溶解物を含む二次元PAGE PVDF膜のIMBでは、Pab245は、このC末端断片と明らかに再現的に反応した。さらにPab245は、これもまたDT4に関して見られたのと同様に、パルス追跡実験において長い代謝回転時間を有する、タンパク質スポットDT48と反応した。

30

## 【0193】

MALDI MSによって、DT48はCT858のN末端断片としても同定された。DT48の分子配位は、等電点 (pI) 7.3 / 分子量 (Mw) 25.8であった。CT858のN末端部分によって、異なる長さのN末端 (シグナルペプチドなし) に等電点 (pI) / 分子量 (Mw) ツールを使用して、実験によって決定したものと一致したものを有する、ペプチドが生成する。この分析によって、 $K^{233}S^{234}M^{235}$  周辺の切断部位が示唆される。

## 【0194】

CT858のN末端及びC末端断片は、EB段階 (感染後72時間) まですべて二次元ゲル上で検出することができるが、精製されたEB中では検出することができないという事実は、宿主細胞の細胞質中での長い代謝回転時間を示す。このことは、IMF実験による72時間までの、宿主細胞の細胞質中でのCT858の非常に明白な検出と一致した。CT858は大腸菌からの尾部特異的プロテアーゼ (tsp) とわずかな相同性を示し、これはペニシリン結合タンパク質のプロセッシングと関連しており、ヒト内部光受容体レチノイド結合タンパク質からのIRBPドメインを含み、疎水性リガンドを結合させる (Silber他、1992) [32.]。II型分泌は、*P. aeruginosa* 及び *Aeromonas hydrophila* を含めた、いくつかのグラム陰性細菌において、分解性タンパク質の輸送と関連してきている (Hobbs 及び Mattick, 1993に概説された) [33.]。 *Aeromonas hydrophila* では、分泌されるエラスターゼ (ahpB) が、細菌の毒性に関して重要であることが近年示

40

50

唆されてきている (Cascon他、2000) [34.]。

【0195】

これらのタンパク質には、CT858と類似の結末がある。これらのタンパク質は大抵、切断性シグナルペプチドを含むプロペプチドとして合成され、次いで成熟タンパク質にプロセッシングされる。尾部特異的プロテアーゼとも相同性を示す、他のC. trachomatisのタンパク質は、仮想タンパク質CT441である。このタンパク質がCT858と同じ分泌特性を示す可能性があるかどうかは、依然として決定されていない。

【0196】

CT858の同じ亜細胞レベルの局在性が、C. pneumoniae相同体、CPN1016に対するPab253を含むCPN1016に関して観察され、したがって2つのクラミジア種間のこの遺伝子の機能的な保存が示される。 10

【実施例20】

【0197】

その遺伝子番号によって同定した、分泌されたC. trachomatis D及びC. pneumoniaeのタンパク質は、ヒトのHLA-A2と親和性があるペプチドを認識するために調整したANNによって分析した。表V~VIIでは、HLA-A2への予想される結合に関して、ANNによって選択したペプチドを列挙し、その親和性(Kd)をnMで与える。値は低いほど良い。50nM未満のKdを有する大部分のペプチドは、免疫原性である。500nM未満(ただし50nMを超える)のKdを有するペプチドは、免疫原性である可能性がある。所定のペプチドの結合は、アンカー位置P2又はP9の次善のアミノ酸を置換することによって改善することができ、これは天然のペプチドを対象とする特異性を保つことが多い戦略である。 20

【実施例21】

【0198】

実験動物モデル中で、ワクチン候補が特異的な細胞障害性CD8+T細胞を生成する能力の決定

1つの手法では、ワクチン候補を完全長の組み換えタンパク質として使用して、ヒトのHLAクラスI分子を発現するトランスジェニックA2マウスを含めた、実験動物(マウス又はモルモット)を免疫処置する。

【0199】

他の手法では、コンピュータアルゴリズムによって、ワクチン候補をT細胞エピトープに関してスクリーニングし、次にこれらのエピトープを含むペプチドを合成し、完全長のワクチン候補に関して記載したように免疫処置用に使用する。 30

【0200】

第3の手法では、8~10個のアミノ酸長のペプチドを、それらがワクチン候補の配列全体を覆うように重複法で合成し、放射標識した中間結合体と競合する、MHCクラスIの結合アッセイ用に使用する。優れた結合体であるペプチドは、完全長のワクチン候補に関して記載したように免疫処置用に使用する。

【0201】

ワクチン候補は、ペプチド/タンパク質の組合せとして、あるいはアジュバントの単独のペプチド/タンパク質として投与する。ワクチン候補は、DNAワクチンとして、あるいはワクチン候補を発現するウイルスによって投与することもできる。 40

【0202】

免疫処置した動物からの末梢血単核細胞(PBMC)を、密度勾配遠心分離法によって精製し、磁気ビーズに結合する抗体を使用することによって、あるいは他の方法によって、CD8+細胞を精製する。CD8+T細胞の活性は、ELISPOT及びトリチウム化チミジンの取り込みなどの増殖アッセイによって、特異的溶解物のアッセイ(クロム放出)によって測定する。

【0203】

免疫処置した動物からの精製したPBMC又はCD8+細胞を、制限的に希釈して、照射 50

済みの抗原提示細胞、成長因子、及び特異的又は非特異的刺激物質と共に、マイクロタイタープレート上に置く。特異的な刺激に関しては、優れたT細胞エピトープとして予想されたか、あるいはMHCクラスI分子への優れた結合体であることが見出された、単独のワクチン候補タンパク質又はペプチドを使用する。非特異的な刺激に関しては、クラミジア感染した細胞を使用する。細胞は9～14日間培養し、その間に抗原特異的な細胞が増殖する。特異的な細胞障害性CD8+T細胞の生成は、ELISPOTアッセイによって刺激された細胞からのサイトカイン分泌を測定することによって決定する。T細胞の増殖は、トリチウム化チミジンの取り込み、次にシンチレーション計測によって測定する。増殖した細胞の細胞障害性は、クラミジア感染した細胞、又は標的細胞と同様にワクチン候補タンパク質/ペプチドを発現する組み換え細胞を使用する、クロム放出アッセイなどの細胞障害性アッセイを使用して測定する[42.]。 10

【実施例22】

【0204】

クラミジア感染に対してマウス及びモルモットを保護する能力に関する、ワクチン候補の試験

実験動物を(前に記載したように)、単独のタンパク質/ペプチドとしてのワクチン候補で、あるいはワクチン候補の組合せで免疫処置する。免疫処置の次に、それらの動物をクラミジアで(C.pneumoniaeに関しては鼻腔内感染、及びC.trachomatisに関しては性感染)、実験的に感染させる。感染に対する保護は、クラミジアを培養すること、免疫組織化学法、定量的PCR、及び感染による血清変換を調べることによって測定する。 20

【実施例23】

【0205】

ヒト中で、クラミジア感染がワクチン候補特異的な細胞障害性CD8+T細胞を生成する能力の決定

ヒトの血清サンプルを、クラミジアに対する抗体の存在に関して、ELISA(Medac)によって試験する。ワクチン候補特異的な細胞障害性CD8+T細胞の存在に関して、血清陽性の個体を選択する。

【0206】

クラミジアに関して抗体陽性であると試験されるヒトからの、末梢血単核細胞(PBMC)を、密度勾配遠心分離法によって精製し、抗体及び磁気ビーズを使用すること、又は他の方法によって、CD8+細胞を精製する。ワクチン候補タンパク質/ペプチドを特異的に対象とするCD8+T細胞の活性は、実施例19に記載した方法によって測定する。 30

【実施例24】

【0207】

診断目的のELISA試験を開発するための、ワクチン候補の使用

本発明の分泌タンパク質は、精製した微細菌中では存在しないか、あるいは大幅に減少しているので、精製した基本小体に基づく免疫アッセイは、このようなタンパク質に対する抗体を検出することができない。したがって分泌タンパク質は、体液性免疫応答とも関連がある、認識されていない主要な抗原であってよい。さらに、分泌されるクラミジアのタンパク質に基づくELISAによって、クラミジアによる持続的な感染を検出することができる。なぜなら分泌タンパク質は、クラミジア分化の細胞内の段階中のみ発現するからである。 40

1)分泌タンパク質は、精製された組み換えタンパク質として生成させる。あるいは、分泌タンパク質を表す重複合成ペプチドも生成させる。

2)ELISAプレートを、分泌タンパク質を表す精製した組み換えタンパク質(又は分泌タンパク質に由来する合成ペプチド)でコーティングする。ELISAプレートを、15%ウシ胎児血清でブロックして、非特異的な結合を回避する。

3)マイクロ-IF又はELISA(Medac)を使用して、C.trachomatis又はC.pneumoniaeに対する抗体に関して、患者の血清をスクリーニングす 50

る。陽性の血清を、分泌タンパク質を表す組み換え抗原でコーティングした、E L I S A プレート上で試験する。

4) 抗体結合抗ヒト I g G を検出するために、I g A 又は I g M を使用する。陽性対照として、感染したマウスからの血清を使用する。

5) ミクロ - I F 又は E L I S A ( M e d a c ) からの結果を、分泌タンパク質を表す組み換えタンパク質に基づく E L I S A と比較する。

【 0 2 0 8 】

## 参考文献

1. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, Huttunen JK, Valtonen V, Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988 Oct 29;2(8618):983-6
2. Shor A, Kuo CC, Patton DL(1992)Detection of Chlamydia pneumoniae in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. *S Afr Med J.*82(3):158-61 10
3. Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Rev* 62, 379-433
4. Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E.V., Davis, R.W.(1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis, *Science* 282, 754-759 20
5. Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C., Fan, J., Hyman, R.W., Olinger, L., Grimwood, J., Davis, R.W., Stephens, R.S (1999). Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis, *Nat. Gent.* 21, 385-389
6. Rock, K.L., Alfred L. Goldberg (1999)Degradtion of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides, *Annu. Rev. Immunol*, 17, 739-779 30
7. Murdin AD, Su H, Manning DS, Klein MH, Parnell MJ, Caldwell HD(1993)A poliovirus hybrid expressing a neutralization epitope from the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis is highly immunogenic.*Infect Immun* ,61(10):4406-14
8. Cerrone MC, Ma JJ, Stephens RS(1991)Cloning and sequence of the gene for heat shock protein 60 from Chlamydia trachomatis and immunological reactivity of the protein.*Infect Immun* ,59(1):79-90 40
9. Igietseme JU, Magee DM, Williams DM, Rank RG(1994)Role for CD8+ T cells in antichlamydial immunity defined by Chlamydia-specific T-lymphocyte clones.*Infect Immun* 62(11):5195-7

10. Subtil A, Blocker A, Dautry-Varsat A (2000) Type III secretion system in *Chlamydia* species: identified members and candidates. *Microbes Infect* 2(4):367-9
11. Fields KA, Hackstadt T (2000) Evidence for the secretion of *Chlamydia trachomatis* CopN by a type III secretion mechanism *Mol Microbiol* 2000 Dec;38(5):1048-60
12. Read, T.D., Brunham, R.C., Shen, C., Gill, S.R., Heidelberg, J.F., White, O., Hickey, E.K., Peterson, J., Utterback, T., Berry, K., Bass, S., Linher, K., Weidman, J., Khouri, H., Craven, B., Bowman, C., Dodson, R., Gwinn, M., Nelson, W., DeBoy, R., Kolonay, J., McClarty, G., Salzberg, S.L., Eisen, J., Fraser, C.M. (2000) Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res* 28, 1397-1406
13. Shirai M, Hirakawa H, Kimoto M, Tabuchi M, Kishi F, Ouchi K, Shiba T, Ishii, K, Hattori M, Kuhara S, Nakazawa T (2000) Comparison of whole genome sequences of *Chlamydia pneumoniae* J138 from Japan and CWL029 from USA. *Nucleic Acids Res* 15:2311-2314
14. Starnbach, M.N., Bevan, M.J.(1994), Cells infected with *Yersinia* present an epitope to class I MHC-restricted CTL., *J Immunol*, 153, 1603-12
15. Rockey, D.D, Heinzen, R.A, and Hackstadt, T. (1995) Cloning and characterisation of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. *Mol. Microbiol* 15, 617-626
16. Bannantine, J., Stamm, W., Suchland, R., Rockey, D.(1998), *Chlamydia trachomatis* IncA is localized to the inclusion membrane and is recognized by antisera from infected humans and primates, *Inct. immun*, 66 , 6017-6021
17. Knudsen K, Madsen AS, Mygind P, Christiansen G, Birkelund S(1999) Identification of two novel genes encoding 97- to 99-kilodalton outer membrane proteins of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun* 67(1):375-83

18. Shaw, A.C., Christiansen, G., Birkelund, S.(1999) Effects of interferon gamma on Chlamydia trachomatis serovar A and L2 protein expression investigated by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 20(4-5):775-80.
19. Shaw, A.C., Christiansen, G., Roepstorff, P., Birkelun, S. (2000) Genetic differences in the Chlamydia trachomatis tryptophan synthase  $\alpha$ -subunit can explain variations in serovar pathogenesis. *Microbes Infect* 2: 581-592 10
20. Gobom J, Nordhoff E, Mirgorodskaya E, Ekman R, Roepstorff P(1999)Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 34(2):105-16 20
21. Gevaert, K., Demol, H., Puype, M., Broekaert, D., De Boeck, S., Houthaève, T., Vandekerckhove, J. (1997) Peptides adsorbed on reverse-phase chromatographic beads as targets for femtomolesequencing by post-source decay matrix assisted laser desorption ionization-reflectron time of flight mass spectrometry (MALDI-RETTOF-MS). *Electrophoresis* 18: 2950-2960
22. Schachter, J., Wyrick, P.B (1994) Culture and isolation of Chlamydia trachomatis. *Methods Enzymol* 236: 377-390 30
23. Harder, A., Wildgruber, R., Nawrocki, A., Fey, S.J., Larsen, P.M., Gorg, A. (1999) Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 20: 826-829
24. Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, S, Boucherie H, Mann M (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large- scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U SA*: 93: 14440-14445 40
25. Mann, M, Wilm, M (1995) Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends Biochem Sci.*,20:219-24

26. Wilm M, Mann M(1996)Analytical properties of the nanoelectrospray ion source Anal Chem 68(1):1-8
27. Wilkins MR, Gasteiger E, Sanchez JC, Appel RD, Hochstrasser DF. Protein identification with sequence tags. Curr Biol. 1996 Dec 1;6(12):1543-4.
28. Mann M, Hojrup P, Roepstorff P. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. Biol Mass Spectrom. 1993 Jun;22(6):338-45. 10
29. Rockey, D.D., Grosenbach, D., Hruby, D.E., Peacock, M.G., Heinzen, R.A., Hackstadt, T.(1997) Chlamydia psittaci IncA is phosphorylated by the host cell and is exposed on the cytoplasmic face of the developing inclusion, Mol. Microbiol., 24, 217-228
30. Forster C, Marienfeld S, Wilhelm R, Kramer R(1998)Organelle purification and selective permeabilisation of the plasma membrane:two different approaches to study vacuoles of the filamentous fungus Ashbya gossypii.,EMS Microbiol Lett 1998 Oct 15;167(2):209-14 20
31. Melan MA(1999) Overview of cell fixatives and cell membrane permeants. Methods Mol Biol 1999;115:45-55
32. Silber, K.R., Keiler, K.C., Sauer, R.T.(1992) Tsp: a tail-specific protease that selectively degrades proteins with nonpolar C termini.Proc Natl Acad Sci U S A ,89, 295-9 30
33. Hobbs, M, Mattick, J.S.(1993) Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. Mol. Microbiol. 10, 233-243
34. Cascon, A., Yugueros, J., Temprano, A., Sanchez, M., Hernanz, C., Luengo, J.M., Naharro, G.(2000) A major secreted elastase is essential for pathogenicity of Aeromonas hydrophila. Infect Immun ,68,3233-41 40
35. Stephens, R.S., Kalman, S., Fenner, C., Davis, R.,(1998b) The Chlamydia Genome Project, <http://socrates.berkeley.edu:4231/>.
36. Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein,L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A.L.(1994) Inhibitors of the proteasome Block the

degradation of Most Cell Proteins and the Generation of Peptides

Presented on MHC Class I Molecules. Cell, 78, 761,771

37. Fling, S.P., Sutherland, R.A., Steele, L.N., Hess, B., D'Orizio, S.E.F.,  
Maisonneuve, J.-L., Lampe, M., Probst, P., Starnbach, M.N. (2001) CD8 T  
cells recognize an inclusion membrane associated protein from the  
vacuolar pathogen Chlamydia trachomatis, PNAS, 98, 1160-1165 10
38. Sijts, A. J., S. Standera, R. E. Toes, T. Ruppert, N. J. Beekman, P. A. van  
Veelen, F. A. Ossendorp, C. J. Melief, and P. M. Kloetzel (2000). MHC  
class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the  
levels of immunoproteasomes in infected cells. J. Immunol., 164, 4500
39. Van Hall, T., A. Sijts, M. Camps, R. Offringa, C. Melief, P. M. Kloetzel,  
and F. Ossendorp (2000) Differential Influence on Cytotoxic T  
Lymphocyte Epitope Presentation by Controlled Expression of Either  
Proteasome Immunoproteasome Subunits or PA28. J. Exp. 20  
Med., 192, 483.
40. Shockett, P., M. Difilippantonio, N. Hellman, and D. G. Schatz (1995). A  
modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible  
gene expression in cultured cells and transgenic mice. Proc. Natl. Acad.  
Sci. USA, 92, 6522
41. Probst, P., Bhatia, A., Skeiky, Y., Jen, S. (1999), International publication  
number: WO 00/34483, PCT/US99/29012Ø 30
42. Hickling K. H. (1998), Measuring human T-lymphocyte function, Expert  
Reviews in Molecular Medicine ISSN 1462-3994
43. Sijts, A.J., Villanueva, M.S., Pamer, E.G: CTL epitope generation is  
tightly linked to cellular proteolysis of a *Listeria monocytogenes* antigen, The  
Journal of immunology, 1996, 156, 1497-1503 40
44. Hess, J., Kaufmann, S.H: Vaccination strategies against intracellular  
microbes, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 1993, 7, 95-104

【図面の簡単な説明】

【0209】

【図1A】感染後 (h.p.i.) 22 ~ 24 時間から [35S] - 標識し、標識直後に  
採取し、二次元 PAGE によって分離した全細胞溶解物からの、C. trachomatis  
D のタンパク質のゲル画像の例を示す図である。黒矢印は、感染後 22 ~ 24 時間 50

から標識し感染後72時間で精製した精製EB(基本小体)からのタンパク質を含むゲル上で、その強度が大幅に低下しているタンパク質を示す。示したスポット(DT1~77)の等電点(pI)及び分子量(Mw)の特性は、表Iに挙げる。

【図1B-1E】図1Aからの選択した領域の拡大によって示される、合成後の異なる時間での、*C. trachomatis* D中の同定したワクチン候補及びそれらの存在の例を示す図である。タンパク質代謝回転の時間は、EBの精製までの発生サイクル中の、標識後の異なる時間で追跡することによって評価した。上部の目盛は、ゼロで始まる標識後の時点を示し、下部の目盛は24時間で始まる感染後の時間を表す。図1B:DT1及びDT2(CT668)。図1C:DT8。図1D:DT7(上矢印)及びDT11(下矢印)(両方共CT610として同定)。図1E:DT3(下矢印、CT783)、DT4(上矢印、CT858)。

10

【図2A】感染後55~57時間から[35S]-標識し、標識直後に採取し、二次元PAGEによって分離した*C. pneumoniae* VR1310のタンパク質のゲル画像の例を示す図である。黒矢印は、発生サイクル中の2時間、すなわち感染後6、12、24、36、42、48、54、60時間に標識し感染後72時間で精製した、EBからのタンパク質のゲル上で、その強度が大幅に低下しているタンパク質を示す。矢印は、精製EBからのゲル上で、強度が大幅に低下しているタンパク質を示す。示したスポット(CP1~91)の等電点(pI)及び分子量(Mw)の特性は、表IIに挙げる。

【図2B-2C】図2Aの拡大部分を示す図である。前に記載したように標識し二次元PAGEによって分離したEBタンパク質の画像の、対応する拡大を示す図である。図2B及び図2Cの拡大部分によって、全細胞溶解物中には存在するがEB中には存在しない、2つのタンパク質、CP63(CPN1016として同定)及びCP65の例を与える。濃縮したスポットはEBと全細胞溶解物の両方に存在し、ポリペプチドデホルミラーゼとして同定されてきている。

20

【図3A】スポット番号DT1を仮想タンパク質CT668として同定するために使用した、ペプチド質量のフィンガープリントを示す図である。中空矢印は、トリプシンの自己消化から生じたペプチドを示す。これらのピークを使用して、スペクトルの内部補正を行った。黒矢印は、CT668配列と整合するペプチド質量を示す。二重矢印は、ヒトの汚染タンパク質に由来するペプチドを示す。

【図3B】図3Aから得たペプチド質量に関する、同定用ソフトウェアMS-Fitの使用からの結果を示す図である。最高位の*C. trachomatis*のタンパク質はCT668であることを示す。

30

【図4A】CT668のアミノ酸配列と整合する、二重電荷1744.9Daの親イオン(R)KIVDWVSSGEEILNR(A)(黒矢印)を含むスポットDT1の、ESI-Q-TOF MSによって生じたペプチド質量スペクトルを示す図である。点線は、親イオンの断片化によって生じたY-ペプチドイオンを示す。推定したアミノ酸配列は、太い一文字のコードで示す。

【図4B】スポットCP63のPSD MALDI MSによって生じたペプチド質量スペクトルを示す図である。1919.8Daの親イオン(K)ELLFGWDLSSQQTQQAR(L)を断片化し、配列を明らかにするいくつかのペプチドを生成した。これらの2つは、243.35Daのb<sub>2</sub>-イオン(EL)及び356.34Daのb<sub>3</sub>-イオン(ELL)によって例示され、これらはロイシンの質量(113Da)だけ質量が異なる。

40

【図5】新規な*C. trachomatis*特異的ワクチンタンパク質候補DT8のヌクレオチド配列、及び一文字のコードによって示される対応するアミノ酸配列を示す図である。太字のアミノ酸配列は、ESI-Q-TOF MSによって得られた配列タグによって覆われていた。

【図6】1つのプロテアソーム阻害剤MG-132と組み合わせた、パルス追跡実験を示す図である。図6.1:感染後22~24時間から標識し、20µMのMG-132の存在下でさらに4時間追跡した、*C. trachomatis* Dのタンパク質を載せた、

50

二次元ゲルの全体のゲル画像。図 6 A、6 B 及び 6 C : M G - 1 3 2 と共に ( 追跡 + M G - 1 3 2 ) あるいは M G - 1 3 2 なしで ( 追跡 ) 行った追跡実験を比較すると、M G - 1 3 2 で処理したためにより長い代謝回転時間を有する、C . t r a c h o m a t i s D のタンパク質を含む領域の拡大図。最初の列は、2 時間の標識時間の直後に採取した感染細胞の、タンパク質プロファイルを表す。M G 1 3 2 を用いずに標識の直後に採取した全細胞溶解物を含むゲルと比較して、M G 1 3 2 の存在下で標識及び追跡した全細胞溶解物を含むゲル上で、D T 9、D T 1 0 及び D T 1 1 の強度が著しく高いことを言及しておく。

【図 7 A】P A b 2 4 5 を使用した全細胞溶解物の I M B の、全体のゲル画像を示す図である。A 1 : それぞれ C T 8 5 8 の C 末端及び N 末端断片である、スポット番号 D T 4 及び D T 4 8 との反応を示す I M B。A 2 : 対応する I M B の放射標識されたバックグラウンド。 10

【図 7 B】Y s c N ( B 1 ) に対する P A b 2 4 1、及び C T 6 6 8 ( スポット D T 1 及び D T 2 ) ( B 4 ) に対する P A b 2 3 8 を用いる I M B を示す図である。I M B の対応するオートラジオグラフィは、B 2 : Y s c N 及び B 5 : C T 6 6 8 との同時局在を示す。分析二次元ゲル上には、Y s c N ( B 3 ) 及び C T 6 6 8 ( B 6 ) が局在する。

【図 7 C】C T 6 1 0 に対する P A b 2 5 5 を用いる I M B を示す図である。C 1 : P A b 2 5 5 がスポットの列を染色することを示す、二次元ゲルプロットの拡大図。上部は D T 7 を表し、下部は D T 9、1 0、1 1 及び 1 2 を表す。C 2 : 感染後 3 0 時間で細胞を採取する前に、M G 1 3 2 を用いて 6 時間、感染細胞を処理した影響を示す拡大図。M G 1 3 2 処理によって、D T 7 を表す列と比較して、D T 9、D T 1 0、及び D T 1 1 の量の明らかな相対的増加をもたらされることを言及しておく。C 3 : 対応する標識された分析ゲル。C 4 : P A b 2 5 5 を用いる S D S - P A G E I M B : レーン a 及び c : 感染後 3 0 時間で採取した全感染細胞溶解物の、( それぞれ ) 2 0 μ g 及び 1 0 μ g。レーン b 及び d : 感染後 3 0 時間で細胞を採取する前に、5 0 μ M の M G 1 3 2 で 6 時間処理した全感染細胞溶解物の、( それぞれ ) 1 0 μ g 及び 5 μ g。 20

【図 8】ワクチン候補の亜細胞レベルの局在性を示す、間接的な免疫蛍光顕微鏡検査を示す図である。A 及び B : C . t r a c h o m a t i s D で感染させ、感染後 2 4 時間でホルマリンで固定した H e L a 2 2 9 細胞。C : C . p n e u m o n i a e で感染させ、感染後 7 2 時間でホルマリンで固定した H E p - 2 細胞。列 1 は、N o r m a s k y 画像を示す。列 2 は、ローダミン結合 G A M I g G 抗体によって目に見える状態にした、C . t r a c h o m a t i s M O M P に対する M A b 3 2 . 3 との反応を示す。列 3 は、F I T C H 結合 G A R I g G 抗体によって目に見える状態にした、問題のワクチン候補に特異的なウサギポリクローナル抗体との反応を示す。調べたワクチン候補は、A : D T 8、B : C T 8 5 8、C : C P N 1 0 1 6 ( C . p n e u m o n i a e の C T 8 5 8 相同体 ) である。白い単頭矢印は、感染細胞中のクラミジア封入体の境界を示す。中空の矢印は、感染していない細胞を示す。C P N 1 0 1 6 が、C T 8 5 8 と同じ亜細胞レベルの局在性及び分泌特性を示すことを言及しておく。 30

【図 9】I I I 型分泌亜群 1、2 及び 3 中に位置する、同定したタンパク質を含めた C . t r a c h o m a t i s D からの同定したワクチン候補のいくつかの例の、ゲノムの局在性を示す図である。 40

【図 1 0】感染後 2 2 ~ 2 4 時間から標識した感染細胞の全溶解物、標識し同じ時点で精製した R B、及び感染後 7 2 時間で精製した E B からの、二次元ゲル画像中の C . t r a c h o m a t i s D から分泌される候補の位置を示す図である。ゲルはすべて、非線状で p H 3 ~ 1 0 である I m m o b i l i n e D r y s t r i p を使用して作製した。感染後 2 2 ~ 2 4 時間 : 感染後 2 2 ~ 2 4 時間から [ 3 5 S ] - 標識し、標識直後に採取し、二次元 P A G E によって分離した感染細胞の全溶解物からの、C . t r a c h o m a t i s D のタンパク質の、図 1 A に示したゲル画像の拡大図。精製した R B : 感染後 2 2 ~ 2 4 時間から標識した直後に、感染後 2 4 時間で R B として精製した細菌からの、C . t r a c h o m a t i s D のタンパク質のゲル画像からの対応する領域。精製し 50

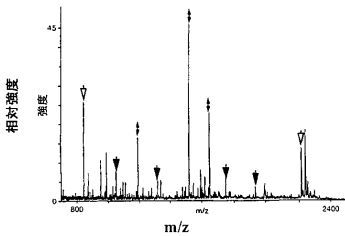
たEB：感染後22～24時間から標識し、感染後72時間でEBとして精製した細菌からの、タンパク質のゲル画像からの対応する領域。列A～Gにおいて、分泌される候補DT4、DT48、DT23、DT76、DT77、DT47及びDT75が濃縮された。

【図11】感染後55～57時間から標識した感染細胞の全溶解物、精製したEB、感染後34～36時間で標識した感染細胞の全溶解物、及び標識し同じ時点で精製したRBからの、二次元ゲル画像中の*C. pneumoniae* VR1310から分泌される候補の位置を示す図である。感染後55～57時間：感染後55～57時間から[35S]-標識し、標識直後に採取し、非線状でpH3～10であるImmobiline Drystripを使用する二次元PAGEによって分離した、細胞の全溶解物からの、*C. pneumoniae* VR1310のタンパク質の、図2Aに示したゲル画像の拡大図。精製したEB：発生サイクル中の2時間、すなわち感染後6、12、24、36、42、48、54、60時間に標識し、感染後72時間でEBとして精製した細菌からの、タンパク質のゲル画像からの対応する領域（非線状でpH3～10であるImmobiline Drystrip）。感染後34～36時間：感染後34～36時間で標識し、標識直後に採取した感染細胞の全溶解物からの、*C. pneumoniae* VR1310のタンパク質のゲル画像からの対応する領域（線状でpH4～7であるImmobiline Drystrip）。感染後36時間のRB：感染後34～36時間から標識した直後に、感染後36時間でRBとして精製した細菌からの、*C. pneumoniae* VR1310のタンパク質のゲル画像からの対応する領域（線状でpH4～7であるImmobiline Drystrip）。A～Fにおいて、分泌される候補CP34、CP37、CP46、CP47、CP52、CP63及びCP75が濃縮された。Gは、分泌される候補を含まないA～F中の領域の、親画像からの領域を示す。

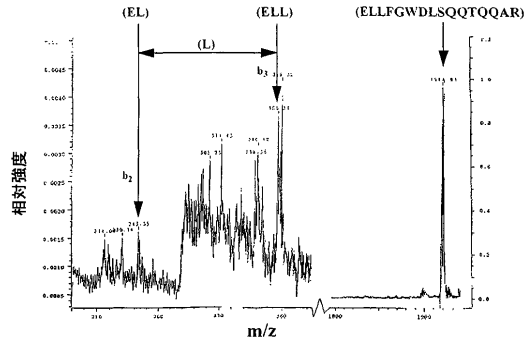
10

20

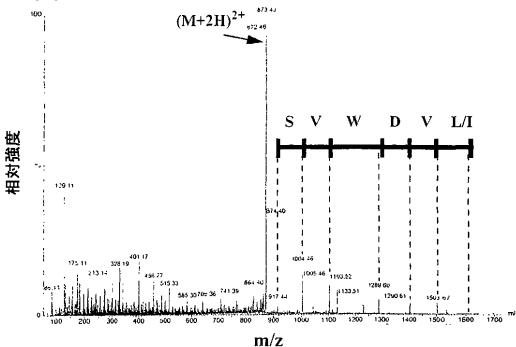
【図3A】



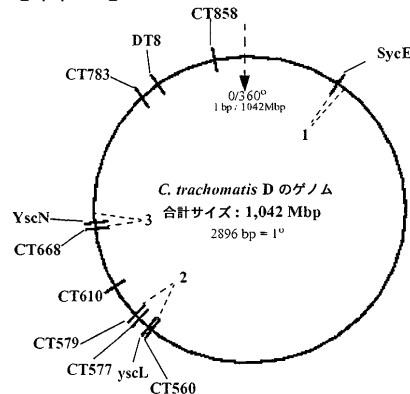
【図4B】



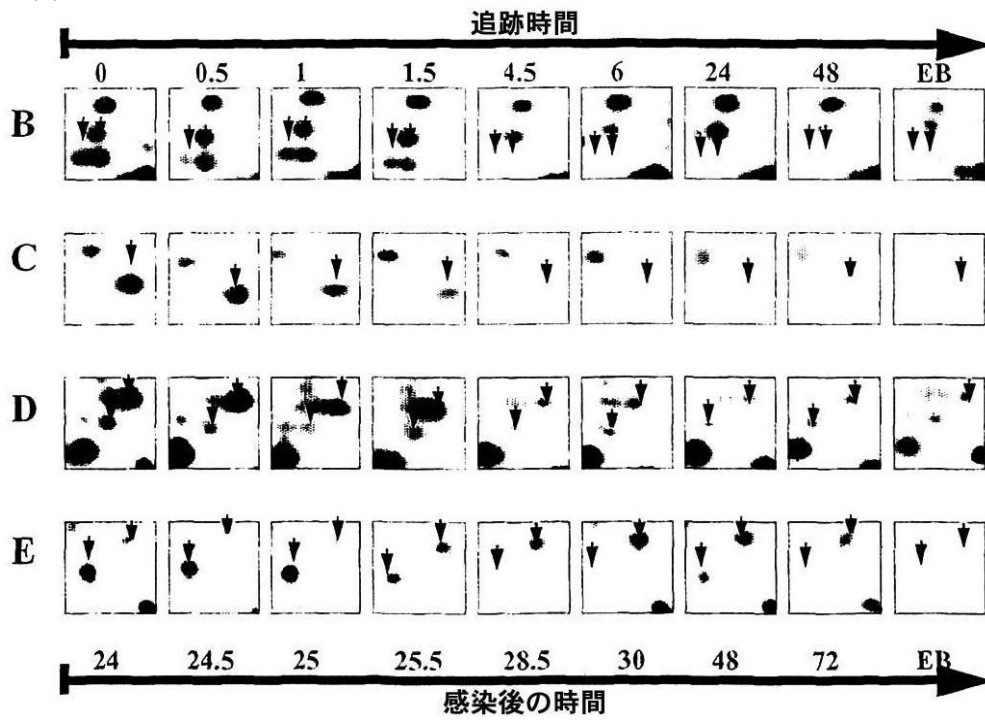
【図4A】



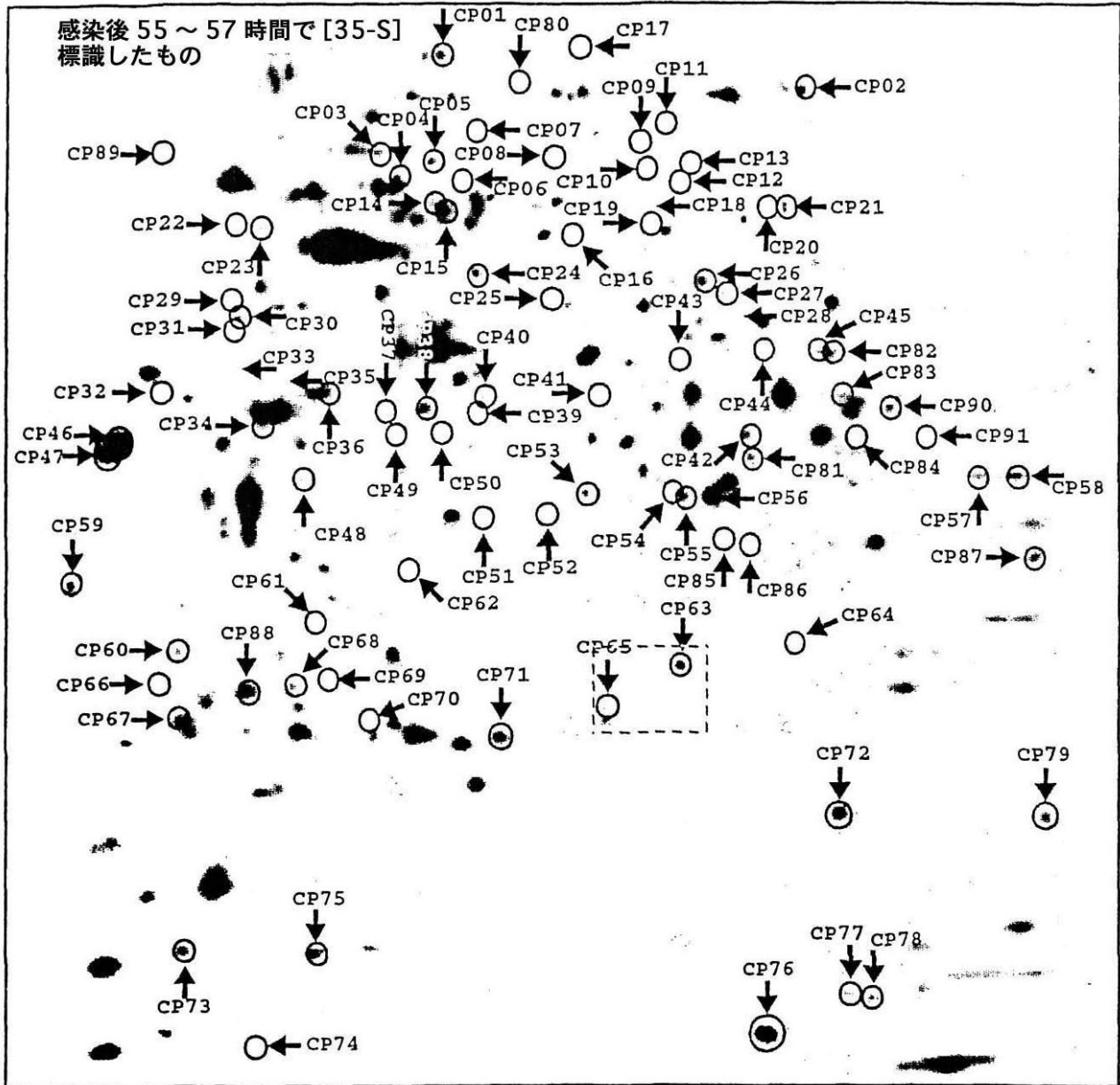
【図9】



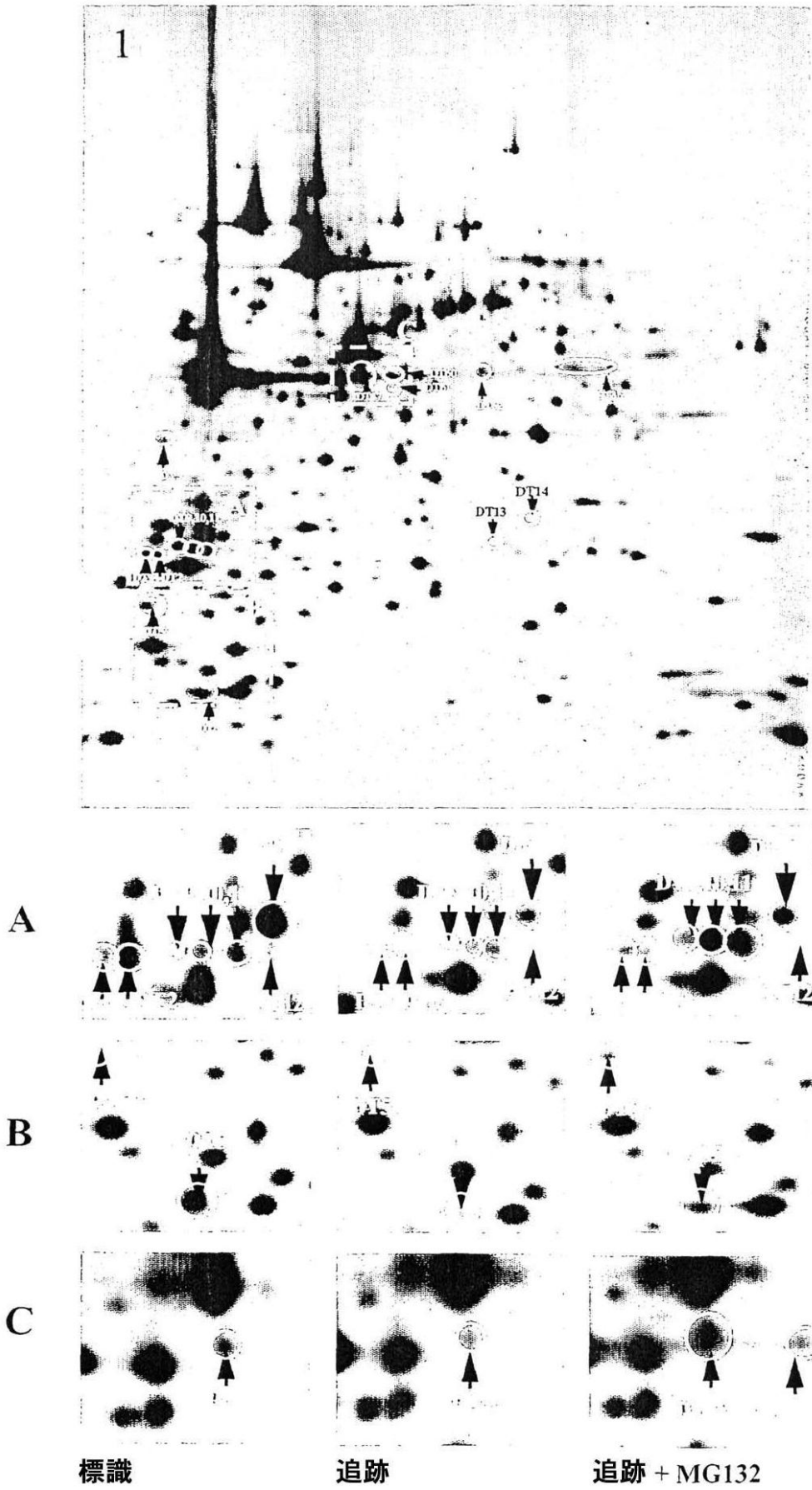
【図 1 B - 1 E】



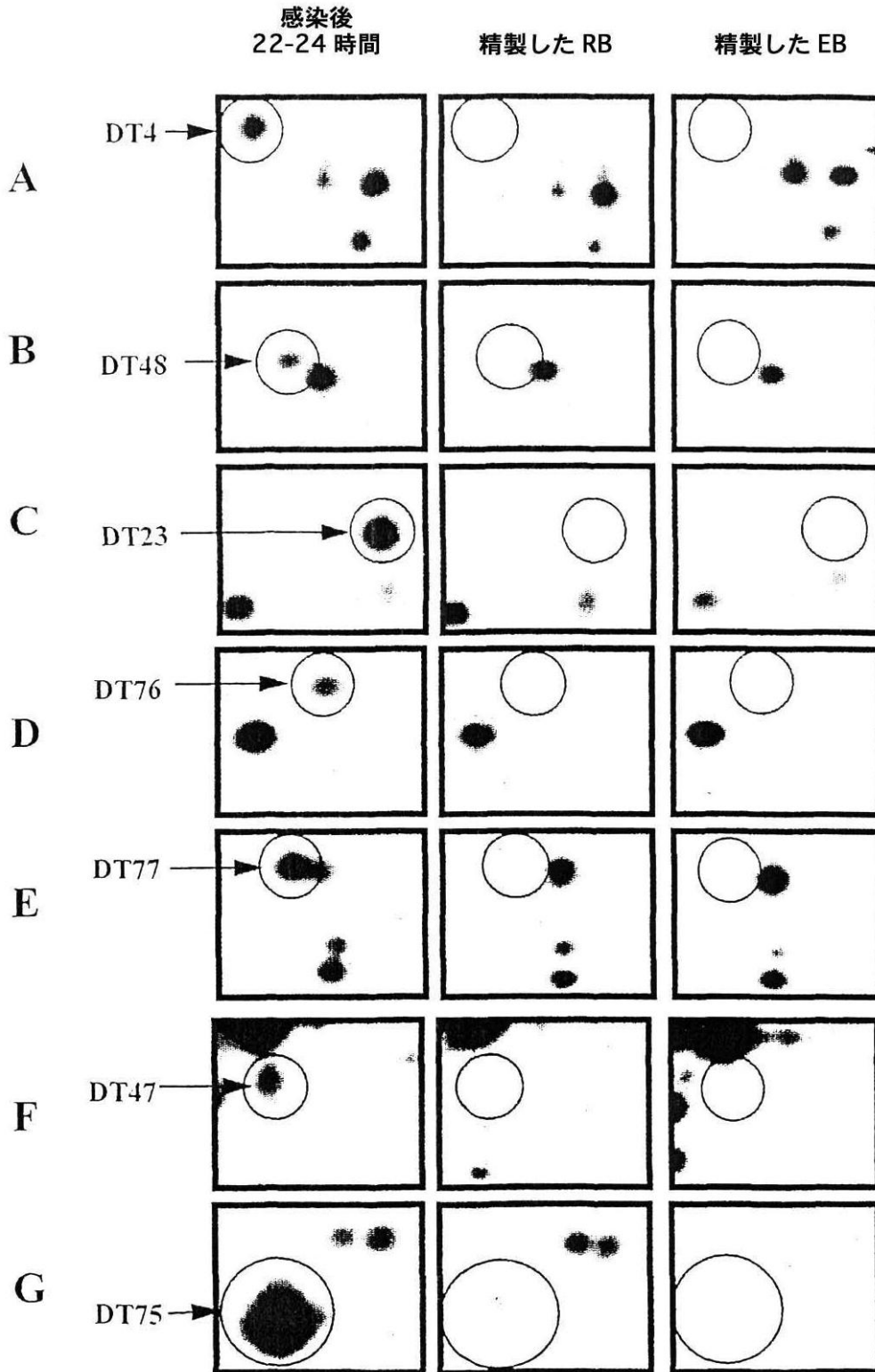
【 図 2 A 】



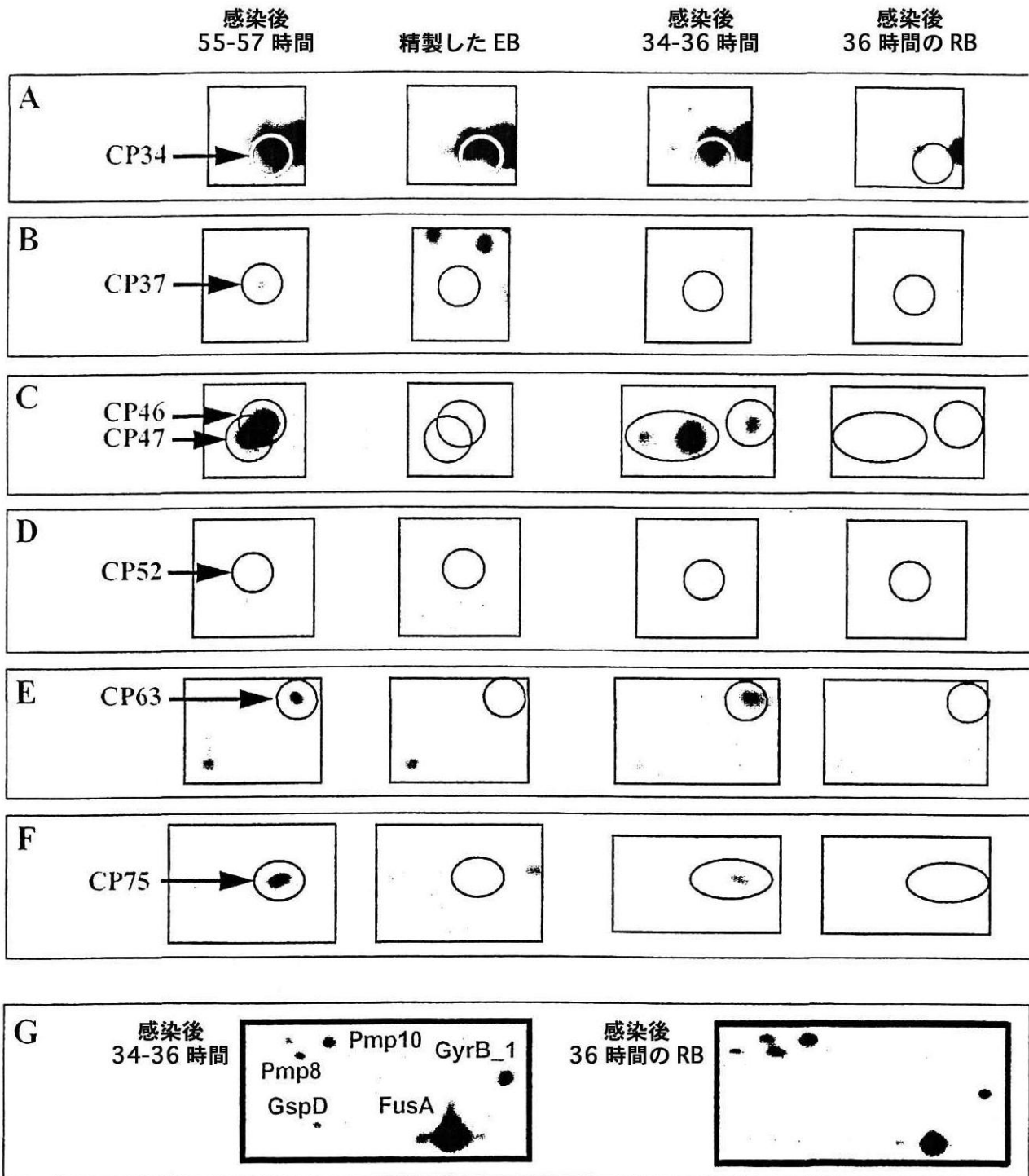
【 図 6 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/082091 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68, C07K 14/295, A61K 39/118
- (21) International Application Number: PCT/DK02/00234
- (22) International Filing Date: 9 April 2002 (09.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
PA 2001 00581 9 April 2001 (09.04.2001) DK  
60/282,513 9 April 2001 (09.04.2001) US
- (71) Applicants and  
(72) Inventors: SHAW, Allan, Christian [DK/DK]; Grønning-  
en 3, 3.4h., DK-8000 Aarhus C (DK); VANDAHN, Brian,  
Berg [DK/DK]; Skovvangvej 154, st.tv., DK-8200 Aarhus  
N (DK).
- (74) Agent: HOFMAN-BANG ZACCO A/S; Hans  
Bekkevold A116 7, DK-2900 Hellerup (DK).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW);  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM);  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— without international search report and to be republished  
upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/082091 A2

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFICATION OF PROTEINS FROM INTRACELLULAR BACTERIA

(57) Abstract: The present invention relates to a novel combination of methods that enables identification of proteins secreted from intracellular bacteria regardless of the secretion pathway. The invention further provides proteins that are identified by these methods. Secreted proteins are known to be suitable candidates for inclusion in immunogenic compositions and/or diagnostic purposes. The invention also provides peptide epitopes (T-cell epitopes) from the identified secreted proteins, as well as nucleic acid compounds that encode the proteins. The invention further comprises various applications of the proteins or fragments thereof, such as pharmaceutical and diagnostic applications.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

1

**Method for identification of proteins from intracellular bacteria****TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION**

The present invention relates to a novel combination of methods that enables identification of proteins secreted from intracellular bacteria regardless of the secretion pathway. The invention further provides proteins that are identified by these methods. Secreted proteins are known to be suitable candidates for inclusion in immunogenic compositions and/or diagnostic purposes. The invention also provides peptide epitopes (T-cell epitopes) from the identified secreted proteins, as well as nucleic acid compounds that encode the proteins. The invention further comprises various applications of the proteins or fragments thereof, such as pharmaceutical and diagnostic applications.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

The *Chlamydia* are obligate intracellular bacteria, which multiply inside eukaryotic host cells and are important human pathogens. The order *Chlamydiales* comprises one family (*Chlamydiaceae*) containing one genus (*Chlamydia*), which is divided into the four species: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* and *C. pecorum*.

The human pathogenic serovars of *C. trachomatis* are divided into: A-C which afflict ocular diseases; and D to K, which are sexually transmitted and causes urethritis or complications such as salpingitis, epididymitis and ectopic pregnancies; and L1 to L3 which cause a severe systemic infection, lymphogranuloma venereum (LGV). The human pathogen *C. pneumoniae* is responsible for respiratory tract infections causing bronchitis and pneumonia and has recently been associated with the development of atherosclerosis (Saikku *et al*, 1988 [1.], Shor *et al*, 1992 [2.]).

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

2

If left untreated *Chlamydia* infections may become chronic with severe complications such as sterility, blindness and potentially thrombosis.

- 5 Due to the intracellular developmental cycle persistent *Chlamydia* infections may cause an aberrant immune response, which fails to clear the organisms. Many immunogenic *Chlamydia* proteins have been considered vaccine candidates, especially surface exposed proteins such as the major outer membrane protein (MOMP) that is immunodominant in *C. trachomatis* [7.],  
10 but also stress response proteins such as Hsp60 [8.]. However, none of these candidates have been proven efficient in vaccine trials.

- A likely explanation for the limited humoral response and little protective immunity is the intracellular nature of the organism. An alternative approach  
15 is therefore to find proteins, which are recognizable by the cell-mediated immune system, which has been shown to be pivotal in the resolution of chlamydial infection primarily through the effect of cytotoxic T-lymphocytes (CTL) (Igitseme *et al* 1994 [9.])

- 20 Great attention has been drawn to secreted proteins since these may be processed in the host cell proteasomes and presented as MHC-class I antigens on the surface of cells and thus represent obvious vaccine targets (Hess and Kaufmann, 1993 [45]). An example of this was shown for *Yersinia* infected cells, which presents an epitope of the YopH effector to MHC  
25 restricted cytotoxic T-lymphocytes (CTL). (Stambach & Bevan, 1995 [14.]) The interaction between *Chlamydia* and the host cell is essential for the intracellular survival and propagation of the bacteria.

- Complete and searchable *Chlamydia* genomes exist for *C. trachomatis*  
30 serovar D (Stephens *et al*, 1998 [4.]) (comprising 894 predicted open reading frames (ORFs)) and *C. pneumoniae* VR1310 (comprising 1073 ORFs)

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

3

(Kalman *et al.* 1999 [5.]). In addition complete genomes of *C. trachomatis* MoPn (Read *et al.*, 2000 [12.]) *C. pneumoniae* AR39 (Read *et al.* [12.] and *C. pneumoniae* J138 (Shirai *et al.* 2000 [13.]) are public available. From the genome sequence it is known that *Chlamydia* possesses genes involved in secretion mechanisms including several genes with homology to type III secretion genes from other organisms (Stephens *et al.*, 1998 [4.] and Kalman *et al.*, 1999 [5.]).

Candidates for secreted effector proteins are likely to be present in Type III secretion subclusters (Subtil *et al.*, 2000) [10.]. This view was recently illustrated by the discovery of the Type III secretion characteristics of CopN (Fields & Hackstadt 2000) [11.] Type III secreted proteins, however, lack recognisable signal peptidase cleavage sites and no consensus sequence for proteins secreted by this system in *Chlamydia* has been recognized, such as may be restricted to the particular organism in question. Moreover, secreted proteins may be a functionally diverse group of proteins located in unpredictable locations in the genome (Subtil, 2000) [10.].

The present state of knowledge concerning secreted *Chlamydia* effector proteins is limited to proteins present in the inclusion membrane including members of the Inc family (Rockey *et al.* 1995) [15.] [16.], CopN (Fields & Hackstadt, 2000 [11.]) and CT529 (Fling *et al.*, 2001) [37.].

It has been shown that CD8+ T-cells specific for *Chlamydia* arise during an infection, meaning that *Chlamydia* proteins are exposed to the host cell cytoplasm which is a prerequisite for presentation of MHC class I antigens. CT529 has been identified from a genomic library by expression in a eukaryotic cell and recognition by a *Chlamydia* specific T-cell line (Probst) [41]. CT529 has been shown to contain an epitope, which in mouse vaccine experiments provides some protection against infection.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

4

Expression in eukaryotic cells of a genomic *Chlamydia trachomatis* serovar L2 library by transfection with a viral vector and subsequently screening with *Chlamydia* specific T-cells for the detection of proteins comprising MHC class I restricted epitopes has been described in The International Patent

5 Application No. WO 00/34483 (Probst) [41]. This method has resulted in the identification of five positive clones, CT529 was contained in one of these, another clone contained three open reading frames but the remaining three clones have not been described further. Drawbacks of such a screening is the eukaryotic expression of bacterial proteins which may differ from bacterial

10 expression in a way that alters the probability of processing in the proteasome and the very presentation as MHC antigens, and the maintenance and stimulation of T-cell clones differ from the *in vivo* situation and clones recognizing proteins, which are not accessible during a normal infection may result in false positives. Other approaches in the above patent

15 application concerns identification of candidates for a vaccine directed against the humoral immune defence.

When searching for proteins secreted from intracellular bacteria, the straightforward idea would be to isolate the cytoplasm from infected host

20 cells and look for bacterial proteins. However, this strategy cannot be employed for *Chlamydia* due to the fragility of the chlamydial reticulate body. Another approach would be to identify pathogenicity factors, which are often secreted proteins, by transposon analysis. However, it is not possible to transfect *Chlamydia*. No strategy exists that can predict which proteins are

25 secreted and genes encoding effector proteins suitable for vaccine development may be located in unpredictable locations in the genome.

Thus, there is a need for a reliable system, which can limit the number of vaccine candidates in a cost efficient way and which involves a minimum of

30 experimental steps.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

5

In [18] the effect of IFN- $\gamma$  *C. trachomatis* A and L2 protein expression was investigated by means of [35S]-methionine/cysteine labelling of *C. trachomatis* proteins in combination with autoradiography following 2D-gel electrophoresis. IFN- $\gamma$  added during the infection of HeLa cell cultures with *C. trachomatis* A resulted in a pronounced down-regulation of several *C. trachomatis* A proteins, whereas this effect was not apparent for *C. trachomatis* L2. IFN- $\gamma$ -dependent induction of ~30 and ~40 kDa proteins in both *C. trachomatis* A and L2 was observed. The induction of these proteins was antagonized by addition of super-physiological amounts of L-tryptophan to the growth medium. This indicated that the IFN- $\gamma$  mediated inducibility of these *C. trachomatis* proteins is associated with IFN- $\gamma$  mediated up-regulation of the tryptophan degrading host cell enzyme indoleamine 2, 3 dioxygenase. One of the IFN-induced *C. trachomatis* proteins migrated with a significantly lower molecular weight in *C. trachomatis* A compared to *C. trachomatis* L2.

15 In [19] The IFN- $\gamma$  inducible *C. trachomatis* A and L2 proteins described previously (Shaw et al. 1999) were further characterized. Using MALDI-TOF mass spectrometry followed by database search the proteins were identified as the *C. trachomatis* tryptophan synthase alpha (TrpA) and beta (TrpB) subunits from preparative 2D-gels. The proteins were also induced by IFN- $\gamma$  in *C. trachomatis* D and the induction was prevented by addition of super-physiological amounts of L-tryptophan in all three serovars. TrpA in *C. trachomatis* A migrated with a lower molecular weight in *C. trachomatis* A compared to *C. trachomatis* D and L2. *C. trachomatis* A and C TrpA are truncated by ~7.7 kDa compared to *C. trachomatis* D and L2 TrpA as revealed by analysis of the *trpA* gene from these *C. trachomatis* serovars. The truncation or absence of tryptophan synthase in the trachoma causing serovars (*C. trachomatis* A, B and C) may impair the tryptophan synthesizing ability and render these serovars more susceptible to IFN- $\gamma$  mediated tryptophan depletion. This can explain differences seen in pathogenesis among human *C. trachomatis* serovars.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

6

In [43] the host cell proteasomal degradation of a previously described secreted protein (p60) of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* was investigated. The general strategy used was based on pulse chase assays using [<sup>35</sup>S]-methionine/cysteine labelling in the presence or absence of two peptidealdehydes: N-acetyl-Leu-Leu-norleucinal(LLnL) and (benzyloxycarbonyl)-Leu-Leu-phenylalaninal (Z-LLF), which inhibit the proteolytic activity of the eukaryotic proteasome. Polyclonal antibody raised against p60 was used to immunoprecipitate p60 from proteasome inhibitor treated and non-treated lysates of *L. monocytogenes*-infected J774 cells. Evaluation of autoradiographs of immunoprecipitated labelled p60 separated by one-dimensional SDS PAGE suggested that proteasome inhibitors were able to inhibit proteasome degradation of p60. The number of p60- CTL epitopes per infected cell decreased upon treatment with LLnL and Z-LLF. This suggested a link between inhibition of proteasomal degradation of p60 and p60-CTL epitope production.

In [44] mechanisms behind protective immunity and general features of the cellular immunereponse towards intracellular microorganisms were described with the focus on development of viable recombinant vaccines against intracellular microbes. Strategies for developing antigen delivery systems were discussed with emphasis on *Mycobacterium bovis* BCG and *Salmonella typhi* aroA'. These non-virulent intracellular bacteria can be genetically modified to deliver antigens, which may serve as targets for a vaccine by immune recognition. The authors point out the advantages of using secreted proteins as targets for the development of a vaccine as these proteins will be processed and presented to the cell-mediated immunesystem while the bacterium still replicates inside the host cell.

30 **SUMMARY OF THE INVENTION**

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

7

The present invention comprises the identification of secreted proteins by a novel combination of methods. The described combination of methods constitutes a secretome (the collection of secreted proteins) by subtraction of the proteome of intracellular bacterial proteins from the total proteome of bacterial proteins present in infected cells.

The bacterial proteins are selectively visualized by pulse labelling in the presence of an inhibitor of eukaryotic protein synthesis followed by two dimensional electrophoresis and autoradiography. Protein profiles of purified bacteria are compared to protein profiles of the total lysate of infected cells and the protein spots present in the differential image, the secretome, are identified from gels loaded with total lysate of infected cells by advanced mass spectrometric methods.

The identified secreted proteins are further analysed by advanced artificial neural networks to provide peptide sequences that are predicted to be good T-cell epitopes.

Furthermore, proteins are selected for which the turnover is delayed by inhibitors of the host cell proteasome since these proteins are especially likely to be degraded in the host cell proteasome and presented as MHC class I antigens on the host cell surface.

Compared to other strategies for identification of vaccine candidate proteins and epitopes, the present invention provides a limitation of the number of candidates, which can only be obtained by the novel combination of methods.

The invention is based upon the following observations:

- Proteins that are secreted from an intracellular bacteria into the host cell will be absent from purified bacteria but present in whole lysates of infected cells.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

8

- 2D protein profiles of purified bacteria as well as whole lysates of infected cells can be made visible by two-dimensional electrophoresis using specific pulse-labelling of bacterial proteins.
- 5 • Subtraction of the 2D protein profile of purified bacteria from the 2D protein profile of bacterial proteins present in the host cell enables the identification of secreted proteins by mass spectrometry methods.
- Proteins that are secreted from an intracellular bacteria, which are processed by the host cell proteasome are likely to generate MHC class I antigens, which are capable of activating T-cells.
- 10 • Secreted proteins, which exhibit a prolonged turnover in response to the addition of inhibitors of the eukaryotic proteasome, are likely to be presented at the host cell surface. The identification of such proteins is enabled by analysis of 2D proteins profiles.
- 15 • T-cell epitopes can be predicted by artificial neural networks trained to recognize peptides that have a high affinity for the MHC class I complex.

The following definitions are used in connection with the present invention:

## 20 DEFINITIONS

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

9

Secretome

Proteins that are very likely to be secreted from an intracellular bacteria.

(Type III) Secretion subclusters

5 A cluster of *Chlamydia* genes which contains genes that have significant  
homology to type III secretion gene from other organisms. By the definition of  
secretion cluster is meant a collection of ORFs (open reading frames) with  
known or unknown function, which are located up to four genes away from  
any gene with known homology to genes involved in Type III secretion in  
other bacteria (e.g. *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*.)

10

Proteasome inhibitor

Any chemical synthesized or naturally occurring compound, which is able to  
reversibly or irreversibly inhibit the proteolytic activity of the activated 26S  
eukaryotic proteasome. Persons skilled in the art will recognize that  
15 proteolytic activity of the proteasome contains several different activities (e.g.  
chymotrypsin-like activity, which cleaves after large hydrophobic residues,  
trypsin-like activity, which cleaves after basic residues, post-glutamyl<sup>1</sup>  
hydrolase activity, which cleaves after acidic residue, BrAAP, which cleaves  
preferentially after branched-chain amino acid, SNAAP, which cleaves after  
20 small neutral amino acids of subunits). Several compounds known to inhibit  
the proteasome are commercially available and mostly include cell  
permeable peptide based inhibitors (e.g. peptide aldehydes, peptide vinyl  
sulphones). Peptide based inhibitors act as transition state analogs, which  
form an adduct with the proteasome's active sites, whereas the naturally  
25 occurring *clasto*-Lactacystin- $\beta$ -lactone exerts a proteasome inhibiting effect by  
means of irreversible modification of the active sites of the proteasome  
subunits. These compounds and combinations hereof can potentially be used  
to successfully inhibit proteasome function and MHC- class I antigen  
processing (e.g. MG115, MG132, MG262, PSI, *clasto*-Lactacystin- $\beta$ -lactone,

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

10

Epoxyomicin). The application of proteasome inhibitors may be used at any time point throughout the developmental cycle of *Chlamydia* either before, during or after pulse labelling or chase is performed.

#### Host cells

- 5 A host cell is any eukaryotic cell, which can be infected with an intracellular bacteria. A person skilled in the art will recognize that a wide range of immortalized cell lines will be suitable hosts for infection with *Chlamydia* including epithelial cell lines (e.g. HeLa, Hep-2, BHK cells) or immortalized mononuclear cell lines, e.g. U-937. Immortalized host cell may be obtained  
10 from naturally occurring carcinoma or by transformation of primary cells with virus, which carries oncogenic genes, which results in unlimited cell division and growth (eg. SV40). The definition of host cells also includes primary epithelial or endothelial mammalian cell lines, which can be obtained from living mammals or by autopsy, and propagated for a limited time in vitro, and  
15 organ cell culture.

#### Genetically modified host cell

- A person skilled in the art will acknowledge that appropriate host cell also includes host cell, which have been genetically modified to overexpress or suppress genes, which are relevant in context of chlamydial vaccine  
20 development, e.g. genes encoding proteasome subunits or other genes encoding functionally important proteins involved in MHC-class I presentation.

#### Proteasome

- The proteasome is the central enzyme complex of non-lysosomal protein  
25 degradation being an essential component of the ATP-dependent proteolytic pathway catalyzing the rapid degradation of many rate-limiting enzymes, transcriptional regulators and critical regulatory proteins. In eukaryotes it is essential for the rapid elimination of abnormal proteins, aggregated, unfolded or normal host cell proteins as well as proteins coming from intracellular

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

11

bacteria located in the host cell. The proteasome in higher eukaryotes is critically involved in MHC class I antigen processing by degrading proteins to peptides which are delivered to the host cell surface for presentation as T-cell epitopes.

5 Pulse-labelling

By labelling of proteins is meant incorporation of amino acids containing radioactive isotopes (e.g. L-[<sup>35</sup>S]-methionine, L-[methyl-<sup>3</sup>H]-methionine, L-[methyl-<sup>14</sup>C]-methionine, [<sup>35</sup>S]-cysteine, [<sup>3</sup>H]-tryptophane or combinations hereof) in bacterial proteins in a period of time (eg. 0.5 hours, 1 hours, 2  
10 hours, 4 hours, 6 hours) during which the host cell protein synthesis is inhibited using a sufficient concentration of inhibitors of eukaryotic protein synthesis. The labelling can be performed throughout the *Chlamydia* developmental cycle. The labelling medium must be sufficiently enriched with nutrients to allow growth of both the host cell and the pathogen during the  
15 time in which the infected cells grow. The inhibition of host cell protein synthesis may be accomplished through addition of cyclohexamide or other inhibitors of host cell protein synthesis (e.g. emetine) during the labelling period, with the effect of allowing incorporation of the radioactive amino acid only in the protein synthesizing intracellular bacterium. Protein degradation  
20 can be prolonged by adding cell-permeable inhibitors of protein degradation to the growth medium during the labelling period. It is to be noted that the present invention is not limited to the use of radioactive labelling.

Pulse-chase

By chasing labelled proteins after their synthesis the turnover time can be  
25 estimated, e.g. the time span after which the amount of protein synthesised during the labelling period is degraded by preferably more than 75% (e.g. 80%, 90%, 95%, 99%, 100%). This estimation is performed by measuring the optical density of a given protein spot in the gel before and after a chase period and reveals how long time the protein is present in the infected cell.  
30 The chase is performed by replacing the labelling medium with a growth

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

12

medium without the radioactive amino acid and harvesting the infected cells to different time points after labelling. A chase can be performed for varying periods after the labelling (e.g. 0.5 hours, 1 hours, 1,5 hours, 2 hours, 6 hours, 12 hours, 24 hours, 72 hours) and after labelling at various time points in order to determine how long time the protein is present in the infected cell. The mature form of certain proteins may be processed from a propeptide, and thus accumulate during the chase period instead of decreasing in amount. Under these circumstances the mature protein may accumulate before the degradation can be visualized during the chase periods. The time span, during which the protein is degraded, can be prolonged by adding cell-permeable inhibitors of protein degradation to the growth medium during the chase.

#### Lysis buffer

A lysis buffer for use in the present invention is a buffer used to lyse infected cells and solubilize proteins prior to two-dimensional gel electrophoresis.

The lysis buffer contains 9 M Urea, 4% w/v 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propanesulfonate (CHAPS; Roche, Germany), 40 mM Tris Base, 65 mM DTE and 2% vol/vol Pharmalyte 3-10 (Amersham Pharmacia Biotech). For the enrichment of high molecular weight and hydrophobic proteins the lysis buffer alternatively contains 7 M urea, 2 M thiourea, 4% w/v 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propanesulfonate (CHAPS; Boehringer Mannheim, Germany), 40 mM Tris Base, 65 mM dithioerythritol (DTE) and 2% vol/vol Pharmalyte 3-10 (Amersham Pharmacia Biotech).

It is recognized that it is possible to alter the lysis buffer in order to increase the solubility of certain proteins (e.g. thiourea will increase the solubility of hydrophobic and high molecular weight proteins).

Secreted effector protein

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

13

By the term secreted effector protein is meant any protein, which is secreted by the bacteria into the host cell cytoplasm or any intracellular organelle. Secreted effector protein may have great influence on the host/ pathogen relation and due to its presence in the host cell cytoplasm

5 may be targeted to the proteasome and presented as MHC-class I antigens on the surface of the host cell. Secreted effector proteins may be secreted by one of several Sec-dependent or independent systems (e.g. Type I, Type II, Type III, Type IV) described in the literature.

#### Intracellular bacteria

10 Any bacteria, which has the ability to infect and propagate inside a eukaryotic host cell (e.g. *Chlamydia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Legionella*, *Yersinia*). The definition includes intracellular bacteria, which are obligate intracellular meaning that they may only live and propagate using an eukaryotic host cell or facultative intracellular meaning that they may both survive in an

15 extracellular as well as an intracellular milieu.

#### Elementary body (EB)

The collection of *Chlamydia* bacteria purified by ultracentrifugation and characterized by electron microscopy as being about 300 nm in diameter and

20 having a condensed nucleus.

#### Reticulate body (RB)

The collection of *Chlamydia* bacteria purified by ultracentrifugation and characterised by electron microscopy as being about 1000 nm in

25 diameter and having a normal bacterial nucleus.

#### Analytical gel

Any 2D-PAGE gel, which is loaded with a protein sample amount necessary to visualize proteins. The amount applied for analytical purposes in the herein

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

14

described examples is typically 200.000 to 300.000 counts per minutes (cpm) or >100 µg protein for stained gels (e.g. silver stained, Coomassie stained).

Significantly decreased intensity/amount

A reproducible detectable reduction preferably greater than 10% (e.g. 20%, 35%, 50%, 65%, 80%, 90%, 100%) in the optical density integrated over total area of a given spot localized on a 2D-PAGE gel.

Significantly increased intensity/amount

A reproducible detectable increase preferably greater than 10 % (e.g. 20%, 30%, 45%, 60%, 75%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300% or more) in the optical density integrated over total area of a given spot localized on a 2D-PAGE gel.

Preparative gel

A 2D-PAGE gel, which is loaded with a protein sample amount necessary to allow identification of specific protein spots by one of the herein described identification methods (e.g. MALDI-MS, ESI-Q-TOF, Edman degradation). Typically >500 µg is applied on gels for preparative purposes depending on the immobilised pH gradient used. The definition of preparative gels used in the present invention includes gels with proteins that are unfixed, fixed using staining protocols (e.g. silver staining, Coomassie staining) or electroblotted on to PVDF membranes. It is possible to visualize proteins on preparative gels by applying a background of labelled proteins to the preparative gels, which are separated along with the non-labelled proteins. It is also possible to compare such gels with analytical gels in order to excise the exact protein of interest.

25 Vaccine candidate

A protein, which based on results obtained by the methods of the present invention is potentially secreted from an intracellular bacteria. Secreted proteins are accessible for degradation by the host cell proteasome and peptides derived from these proteins may therefore be presented as MHC-

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

15

class I antigens at the surface of the infected cell, thus being recognizable by T-cells. Such proteins will therefore be obvious targets for the development of a vaccine against the intracellular bacteria. A protein described as a vaccine candidate may also serve useful as a component of a diagnostic test.

#### 5 Vaccine

In the present invention the term vaccine is to be understood in its broadest sense as an immunogenic composition, which is able to elicit an adaptive immune response (humoral or cellular). Vaccines candidates, which are able to elicit an adaptive immune response may be administered to animal or  
10 human recipient as injectables either in the form of solutions, suspensions or as emulsions. The vaccine candidate being the active component of the immunogenic composition may be mixed with pharmaceutical acceptable excipients such as water, saline, glycerol and ethanol before injection into the recipient. Injection may be carried out in different ways (e.g. subcutaneously  
15 or intramuscularly). Vaccine candidates may serve as a vaccine either i) in its full length, or ii) as a source for providing immunogenic fragments, e.g. T-cell epitopes. It is acknowledged that specific proteins or peptides alone or in combination with other proteins or peptides may be administered to an animal or human recipient and serve as a vaccine.

20 Furthermore a DNA fragment encoding a vaccine candidate protein can be cloned in a vector, which can be introduced by injection into an animal or a human recipient. The DNA fragment is taken up by e.g. muscle cells and expressed under the control of a promoter, which will be active in eukaryots.  
25 In this so-called DNA vaccine the expressed DNA fragment is capable of stimulating the immune system.

#### MHC class I antigen

A major histocompatibility class I antigen comprises a peptide diverged from  
30 a protein which is exposed to the host cell cytoplasm, which is conjugated to a heterodimeric MHC class I molecule in the endoplasmatic reticulum and is

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

16

presented on the surface of the cell bound in the groove of HLA complex (in humans) where it may serve as a T-cell epitope. The majority of MHC-class I-presented peptides are derived from a protein processed in the cytoplasm of the host cell by the activated 26S-proteasome.

5

HLA

Human leukocyte antigen, the name for the human major histocompatibility complex.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

17

T-cell epitope

A peptide of short length, which bound to a dimeric MHC class I molecule on the surface of a cell, can be recognized by the receptor of a specific cytotoxic T-cell, e.g. consisting of typically 8-10 amino acids.

5 Whole cell lysates

Infected host cells harvested directly in lysis buffer, without prior purification or fractionation. It is recognized that whole cell lysates may be obtained at any time point throughout the chlamydial developmental cycle and that the whole cell lysates will contain a mixture of all proteins present in the infected  
10 host cell including those coming from the bacteria.

Purified bacteria

Bacteria, which is purified from infected cells. Using *Chlamydia* as an example, it is possible to purify both RB and EB as well as intermediate forms of *Chlamydia* by density gradient ultra centrifugation methods,  
15 depending on the time point in the developmental cycle at which the *Chlamydia* are harvested. The purity can be determined by electron microscopy. In the present invention the purity is also readily verified on silverstained 2D gels by estimating the contribution contaminating highly abundant host cell proteins (e.g. actin, beta-tubulin, alfa-tubulin, calreticulin)  
20 to the total optical density of all proteins present on the gels.

Identified protein

Names on proteins identified using identification methods based on mass spectrometry or Edman degradation are indicated following a nomenclature  
25 according to and compatible with the one used for genes in the *Chlamydia* Genome Project available <http://socrates.berkeley.edu>: 4231/ and as published in

i) Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L.,  
30 Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E.V., Davis, R.W.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

18

(1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 282: 754-759

- ii) Kaiman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C., Fan, J., Hyman, R.W., Olinger, L., Grimwood, J., Davis, R.W., Stephens, R.S (1999). Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat Genet.* 21: 385-389

#### ELISPOT

- 10 In the ELISPOT method, T-cells that have been stimulated with antigen in vitro are incubated in microtiter wells pre-coated with anti-cytokine (e.g. IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) antibody. After a period of incubation the local production of cytokines around activated T-cells can be visualized by adding a secondary antibody conjugated to an enzyme such as horseradish peroxidase alkaline
- 15 peroxidase. An estimation of the production of cytokines is done by finally adding a substrate that will be enzymatically converted into a coloured product thus allowing cytokine producing cells to be visualized.

#### Adjuvant

- 20 By adjuvant is meant an emulsion, which contains a specific immunogen, which can elicit an immuneresponse in a mammal recipient (e.g. Freund's adjuvant). It is recognized that an adjuvant together with the immunogen can be supplemented with components such as dried bacteria or bacterial products, which will enhance the immune response in an immunized
- 25 mammal. Alternatively, immunomodulating substances such as lymphokines (e.g., IFN $\gamma$ , IL12) or poly I:C may also be administered together with the immunogen and adjuvant.

#### Seroconversion

- 30 The development of different classes or subclasses of antibodies in response to an antigen.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

19

Micro immunofluorescence (MIF or micro-IF)

An assay, which measures antibodies against fixed bacteria or proteins by immunofluorescence microscopy.

5 Immunogenic

A protein or peptide is immunogenic if it can elicit an adaptive immune response upon injection into a person or an animal.

**DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

10 Figure 1A shows an example of a gel image of *C. trachomatis* D proteins from whole cell lysates [<sup>35</sup>S]-labelled from 22-24 hours post infection (h.p.i.), harvested immediately after labelling and separated by 2D-PAGE. Black arrows mark proteins which intensities are significantly reduced on gels with proteins from purified EB (elementary bodies) labelled from 22-24 h.p.i. and purified 72 h.p.i.. The pI and Mw characteristics of the marked spots (DT1-15 77) are listed in Table I.

Figure 1B-E show examples of identified vaccine candidates and their presence in *C. trachomatis* D at different times after synthesis shown by enlargements of selected areas from Figure 1A. The protein turnover time 20 was estimated by chasing at different times after labelling throughout the developmental cycle until purification of EB. The upper scale indicates points in time after labelling starting with zero; the lower scale represents the time in hours post infection starting with 24 hours. Figure 1B: DT1 and DT2 (CT668). Figure 1C: DT8. Figure 1D: DT7 (upper arrow) and DT11 (lower arrow) (both 25 identified as CT610). Figure 1E: DT3 (lower arrow, CT783), DT4 (upper arrow, CT858).

Figure 2A shows an example of gel image of *C. pneumoniae* VR1310 proteins from whole cell lysates [<sup>35</sup>S]-labelled from 55-57 h.p.i., 30 harvested immediately after labelling and separated by 2D-PAGE. Black

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

20

arrows mark proteins which intensities are significantly reduced on gels of proteins from EB labelled at two hour periods throughout the developmental cycle *i.e.* 6, 12, 24, 36, 42, 48, 54, 60 h.p.i. and purified 72 h.p.i.. Arrows mark proteins which are significantly reduced in intensity on gels from purified EB. The pI and Mw characteristics of the marked spots (CP1-91) are listed in Table II.

Figure 2B shows an enlarged section of Figure 2A.

Figure 2C shows corresponding enlargement of image of 2D-PAGE separated EB proteins labelled as described above. The section enlarged in Figures 2B and 2C gives an example of two proteins CP63 (identified as CPN1016) and CP65, which are present in whole cell lysates but not in EB. The encircled spot is present in both EB and whole cell lysates and has been identified as polypeptide deformylase.

Figure 3A shows a peptide mass fingerprint used to identify spot no. DT1 as the hypothetical protein CT668. Hollow arrows indicate peptides arising from autodigestion of trypsin. These peaks were used to make an internal calibration of the spectra. Black arrows indicate peptide masses matching the CT668 sequence. Doublet arrows indicate peptides originating from a human contaminating protein.

Figure 3B shows results from using the identification software MS-Fit on the peptide masses obtained from Figure 3A, showing that the highest-ranking *C. trachomatis* protein is CT668.

Figure 4A shows a peptide mass spectrum generated by ESI-Q-TOF MS of spot DT1 comprising the double charged 1744.9 Da parent ion (R)KIVDWVSSGEEILNR(A) (black arrow), which matches the CT668 amino acid sequence. Dotted lines point at the Y-peptide ions that were generated

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

21

by fragmentation of the parent ion. The deduced amino acid sequence is shown in bold one-letter code.

Figure 4B shows a peptide mass spectrum generated by PSD MALDI MS of spot CP63. The 1919.8 Da parent ion (K)ELLFGWDL**S**QQT**Q**QAR(L) was fragmented and gave rise to several peptides revealing the sequence. Two of these are exemplified by the 243.35 Da b<sub>2</sub>-ion (EL) and 356.34 Da b<sub>3</sub>-ion (ELL) that differ in mass by the mass of leucine (113Da).

Figure 5 shows the nucleotide sequence of the novel *C. trachomatis* specific vaccine protein candidate DT8 and corresponding amino acid sequence shown by one-letter code. Bold amino acid sequence was covered by sequence tags obtained by ESI-Q-TOF MS.

Figure 6 shows pulse chase studies in combination with one the proteasome inhibitor MG-132. Figure 6.1: Total gel image of a 2D-gel loaded with *C. trachomatis* D proteins labelled from 22-24 h.p.i. and chased for additionally 4 hours in the presence of 20  $\mu$ M MG132. Figures 6A, 6B and 6C: Enlargements of regions containing *C. trachomatis* D proteins, which has a prolonged turnover time due to treatment with MG-132, when comparing chase studies performed with (chased+ MG-132) or without (chased) MG-132. The first row represents protein profiles of infected cell harvested immediately after the two-hour labelling period. Note that the intensity of DT9, DT10 and DT11 is significantly greater on gels with whole cell lysates which are labelled and chased in the presence of MG132 compared to gels with whole cell lysates harvested immediately after labelling without MG132.

Figure 7A shows a total gel image of IMB of whole cell lysates using PAb 245. A1: IMB showing reaction with spot no. DT4 and DT48, which are the C-terminal and N-terminal fragments of CT858, respectively. A2: Corresponding radio labelled background of the IMB.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

22

Figure 7B: IMB with PAb241 against YscN (B1) and PAb238 against CT668 (spot DT1 and DT2) (B4). Corresponding autoradiography of IMB, showing co-localization with B2: YscN and B5: CT668. Localization of YscN(B3) and CT668(B6) on analytical 2D-gels.

5

Figure 7C shows IMB with PAb255 against CT610 C1: Enlargement of 2D-gel blot showing that PAb 255 stains to rows of spots, the upper representing DT7 and the lower representing DT9, 10, 11 and 12. C2: Enlargement showing the effect of treatment of infected cells with MG132 for 6 hours prior to harvesting of the cells at 30 h.p.i. Note that MG132 treatment results in an clear relative increase in the abundance of DT9, DT10 and DT11 compared to the row representing DT7. C3: Corresponding labelled analytical gel. C4: SDS-PAGE IMB with PAb255: Lane a and c: 20 µg and 10 µg (respectively) of whole infected cell lysates harvested at 30 h.p.i. Lane b and d: 10 µg and 15 5 µg (respectively) of whole infected cell lysates treated for 6 hours with 50 µM MG132, prior to harvesting of the cells at 30 h.p.i.

Figure 8 shows an indirect immunofluorescence microscopy showing sub-cellular localization of vaccine candidates. A and B: HeLa 229 cells infected 20 with *C. trachomatis* D and fixed with formalin 24 h.p.i. C: HEp-2 cells infected with *C. pneumoniae* and fixed with formalin 72 h.p.i.. Row 1 shows Normasky images. Row 2 shows reaction with MAb 32.3 against *C. trachomatis* MOMP visualized by rhodamine conjugated GAM IgG antibody. Row 3 shows 25 reaction with rabbit polyclonal antibody specific for the vaccine candidate in question visualized by FITCH-conjugated GAR IgG antibody. The investigated vaccine candidates are A: DT8, B: CT858, C: CPN1016 (CT858 homologue in *C. pneumoniae*). White single headed arrows points at borders of Chlamydia inclusions in infected cells. Hollow arrows point at uninfected 30 cells. Note that the CPN1016 shows the same sub-cellular localization and secreted characteristics as CT858.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

23

Figure 9 shows a genomic localization of examples of identified vaccine candidates from *C. trachomatis* D including identified proteins, which are located in type III secretion subclusters 1,2 and 3.

- 5 Figure 10 shows the position of *C. trachomatis* D secretion candidates in 2D-gel images from whole lysates of infected cells labelled from 22-24 h.p.i., RB labelled and purified at the same point in time and EB purified at 72 h.p.i. All gels have been made using non-linear pH 3-10 Immobiline Drystrips.
- 10 22-24 hpi: enlargements of the gel image shown in Figure 1A of C. trachomatis D proteins from whole lysates of infected cells [35S]-labelled from 22-24 h.p.i. harvested immediately after labelling and separated by 2D-PAGE.
- 15 Purified RB: Corresponding regions from a gel image of *C. trachomatis* D proteins from bacteria purified as RB at 24 h.p.i immediately after labelling from 22-24 h.p.i.
- Purified EB: Corresponding regions from a gel image of proteins from bacteria labelled from 22-24 h.p.i. and purified as EB 72 h.p.i.
- In rows A-G the secretion candidates DT4, DT48, DT23, DT76, DT77, DT47 and DT75 have been encircled.
- 20 Figure 11 shows the position of *C. pneumoniae* VR1310 secretion candidates in 2D-gel images from whole lysates of infected cells labelled from 55-57 h.p.i., purified EB, whole lysates of infected cells labelled at 34-36 h.p.i. and RB labelled and purified at the same point in time:
- 25 55-57 hpi: enlargements of the gel image shown in Figure2A of *C. pneumoniae* VR1310 proteins from whole lysates of cells [35S]-labelled from 55-57 h.p.i., harvested immediately after labelling and separated by 2D-PAGE using non-linear pH 3-10 Immobiline Drystrip.
- Purified EB: Corresponding regions from a gel image (non-linear pH 3-10
- 30 Immobiline Drystrip) of proteins from bacteria labelled at two hour periods throughout the developmental cycle i.e. 6, 12, 24, 36, 42, 48, 54, 60 h.p.i. and purified as EB at 72 h.p.i.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

24

34-36 hpi: Corresponding regions from a gel image (linear pH 4-7 Immobiline Drystrip) of *C. pneumoniae* VR1310 proteins from whole lysates of infected cells labelled at 34-36 h.p.i. and harvested immediately after labelling.

5 RB 36 hpi: Corresponding regions from a gel image (linear pH 4-7 Immobiline Drystrip) of *C. pneumoniae* VR1310 proteins from bacteria purified as RB at 36 h.p.i immediately after labelling from 34-36 h.p.i.

In A-F the secretion candidates CP34, CP37, CP46, CP47, CP52, CP63 and CP75 have been encircled.

10 G shows a region from the parent images of the regions in A-F that contains no secretion candidates.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

15 Comparison of 2D-PAGE protein profiles from whole cell lysates and purified bacteria

Proteins, which are present in whole infected cells but absent from purified bacteria have potentially been secreted from the bacteria, e.g. *Chlamydia*. Thus, an initial method of the invention is a comparison of 2D- PAGE protein profiles of [35S]-labelled *Chlamydia* proteins from whole cell lysates of infected cells labelled at different time points of the developmental cycle to 20 2D-PAGE protein profiles of purified bacteria [35S]-labelled at corresponding time points. This method provides the detection of several proteins, which are clearly present in the protein profile of whole cell lysates, but only faintly detectable or absent in the protein profile of purified bacteria.

25 From a total of approximately 600 protein spots visualized in whole cell lysates at 22-24 h.p.i. by high resolution 2D- PAGE (IPG), these studies elucidated the existence of 77 *C. trachomatis* D proteins, of which the intensity is significantly reduced in elementary bodies (EB). Similarly, 91 30 proteins had significantly reduced intensities in *C. pneumoniae* VR1310, when comparing whole cell lysates from labelling 55-57 h.p.i. to purified EB.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

25

The detected and annotated proteins have the Mw and pi described for protein no. DT1 - DT77 for *C. trachomatis* D, as listed in Table I, and CP1-CP91 for *C. pneumoniae* as listed in Table II.

5 This method gives an overview of potentially secreted proteins necessary for further investigations. The examples shows comparison of whole cell lysates to purified EB labelled either at i) time points corresponding to labelling of the whole cell lysates (*C. trachomatis*) Figure 1 or 2) at time points throughout the entire developmental cycle (*C. pneumoniae*, Figure 2).

10

Purification of RB allows the discrimination between secreted proteins and RB-specific proteins. Protein profiles of whole lysates of infected cells can be compared to protein profiles of RB purified at the same point in time to identify secreted proteins. In this approach RB specific proteins will not be detected as false positives. Proteins synthesized and secreted at the investigated point in time will be detected. Proteins may be synthesized and secreted at other points in time.

15

The method also includes detection of proteins secreted immediately after infection, which may have been synthesised in the preceding developmental cycle. These proteins are visualised by infection with EB labelled in the preceding developmental cycle followed by 2D-PAGE of total cell lysates. At an early stage of the developmental cycle before EB differentiate to RB, host cell cytoplasm is obtained by Saponin penetration of the cell membrane [30, 25 31]. This is only possible because there at this time will be no contamination of *Chlamydia* proteins from disrupting RB.

20

25

#### Identification of vaccine candidates

The vaccine candidate proteins cut out from preparative 2D-gels are identified through advanced mass spectrometric methods.

30

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

26

The excised spots are digested with an enzyme such as trypsin, which generates a number of tryptic peptides. By means of MALDI-MS or other approaches the masses of these peptides are determined with an accuracy of better than 100 parts per million (ppm). Obtained masses are matched to theoretical tryptic cleavage products of all proteins present in databases using the MS-Fit or PeptideSearch software allowing the identification of the analyzed protein on a statistical basis.

When protein spots are cut out from gels loaded with whole cell lysates, contaminating host cell proteins may be located at the same positions as bacteria proteins and as a further complication one spot may contain more than one bacteria protein. To avoid interference from contaminants that may lead to unambiguous identifications, ESI-Q-TOF or post source decay (PSD) may e.g. be used to obtain sequence information of the bacteria protein(s) if necessary.

The method includes proteins, which are identified by mass spectrometry as indicated by examples from *C. trachomatis D* or *C. pneumonia VR1310* in Table III (A and B, respectively).

Accordingly, the invention relates in a first aspect to a method for identifying proteins secreted from an intracellular bacteria, comprising the following steps:

- 1) infecting host cells by the intracellular bacteria,
- 2) labelling the intracellular bacteria present in the infected cells,
- 3) preparing
  - a) whole cell lysates of the infected cells
  - b) purified and lysed bacteria from the infected cells,
- 4) comparing 2D-gel electrophoresis protein profiles of i) the whole cell lysates from step 3a) with ii) the purified and lysed bacteria from step 3b),

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

27

- 5) detecting protein spots from step 4) which are present in the whole cell lysates but absent or present in significantly reduced amount in the purified bacteria,
- 6) identifying the proteins in the spots selected in step 5).

5

Pulse/chase of vaccine candidates

The object of this method is to detect secreted proteins, which are degraded in the host cell. In order to estimate the time for which the identified vaccine candidate proteins are present inside the host cell a series of pulse/chase studies are performed. The turnover time of [35S]-labelled proteins is monitored on 2D-gels by chasing the proteins for various periods after labelling. The turnover time provides valuable information on how fast the proteins are degraded, thus how long they are present inside the infected cell.

15

The method provides estimated turnover times of potentially secreted *C. trachomatis* proteins as exemplified in Table 1.

In this alternative aspect of the invention it relates, accordingly, to a method for identifying proteins secreted from an intracellular bacteria, comprising the following steps:

- 1) infecting host cells by the intracellular bacteria,
- 2) pulse labelling of the intracellular bacteria present in the infected cells,
- 25 3) preparing whole cell lysates of the infected cells after different periods of chase following step 2),
- 4) comparing 2D-gel electrophoresis protein profiles of the whole cell lysates prepared after different period of chase from step 3),
- 30 5) detecting protein spots from step 4) which are present in decreasing amount as chasing periods increase in step 3),

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

28

6) identifying the proteins in the spots selected in step 5).

Pulse chase in combination with proteasome inhibitors

In order to limit the number of candidates suitable for a vaccine, the invention includes proteasome inhibitor methods in combination with pulse chase  
5 studies. These experiments provide an excellent tool for monitoring the effect of the host cell proteasome on the turnover time of secreted Chlamydial proteins.

10 Immunogenic proteins, which are presented on the surface of eukaryotic cell as MHC-class I antigens must be ubiquitinated and cleaved by proteolysis in a multi-catalytic protein complex, the proteasome. The proteasome cleaves immunogenic proteins into peptides of a typical length of 8-10 amino acids. These peptides are transported to the ER (endoplasmatic reticulum), where they are bound to a heterodimeric MHC class I molecule, and the  
15 MHC-antigen complex is subsequently transported to the surface of cells. On the surface of the cell the MHC-antigen complex will be recognizable by specific receptors on cytotoxic T-lymphocytes (reviewed in Rock and Goldberg [6.]).

20 It is possible to inhibit the activity of the eukaryotic proteasome and prevent MHC class I presentation by adding cell-permeable proteasome inhibitors such as peptide aldehydes to cell cultures (Rock et al. 1994) [36.]. *Chlamydia* proteins for which the turnover time is prolonged by the addition of proteasome inhibitors are likely to be secreted from the bacteria and  
25 subsequently processed by the proteasome. In addition, this part of the invention will allow the detection of Chlamydial proteins, which are degraded in the proteasome very shortly after their release into the host cell and therefore only detectable in the presence of proteasome inhibitors.

30 The invention comprises *C. trachomatis D* and *C. pneumonia VR1310* vaccine candidates, which are affected by proteasome inhibitors.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

29

The proteins DT1, DT2, DT3, DT5, DT9, DT10, DT11, DT13, DT14, DT36, DT47, DT59, DT60, DT61, DT62 (as set out in Table IV below) are examples of *C. trachomatis* D vaccine candidates for which the turnover time is  
5 prolonged by addition of proteasome inhibitors during the chase period.

The invention also provides a method for purifying RB, which before harvest are treated with proteasom inhibitors during a labelling period. A comparison of proteasome treated whole cell lysates labelled at the same time as  
10 proteasome inhibitor treated purified RB, will elucidate further, which proteins are secreted to the host cell cytoplasm and degraded in the proteasome. In addition, the host cell lines in these experiments can be genetically altered to overexpress genes, which are pivotal in the processing of MHC class I restricted T-cell epitopes [38, 39, 40] (Sijts,2000, Van Hall,2000, Shockett,  
15 1995). By the use of such cell lines the effect of proteasome inhibitors will be more pronounced. The invention therefore also comprises the use of commercially available host cell lines, which has been genetically modified in genes, which are involved in MHC-class I antigen presentation.

20 Accordingly, the invention relates in another alternative aspect to a method for identifying proteins secreted from an intracellular bacteria, comprising the following steps:

- 1) infecting host cells by the intracellular bacteria,
- 2) cultivating the host cells in the presence and in the absence of  
25 a proteasome inhibitor, respectively,
- 3) labelling the intracellular bacteria present in the infected cells cultivated in the presence and in the absence of a proteasome inhibitor, respectively,
- 4) preparing whole cell lysates of the infected cells,
- 30 5) comparing 2D-gel electrophoresis protein profiles of the whole cell lysates of the infected cells cultivated in the presence and in the absence of a proteasome inhibitor, respectively,

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

30

- 6) detecting protein spots from step 5) which are present in the whole cell lysates cultivated in the presence of a proteasome inhibitor, but absent or present in significantly reduced amount in the whole cell lysates cultivated in the absence of a proteasome inhibitor,
- 5
- 7) identifying the proteins in the spots selected in step 6).

#### Generation of polyclonal antibodies

The invention provides polyclonal antibodies, which are specific for vaccine candidates. The gene encoding the vaccine candidate protein is cloned using e.g. the ligation independent cloning (LIC)-system. Expressed fusion proteins encompassing the sequence of the vaccine candidate are used to immunize rabbits in order to obtain sera containing vaccine candidate specific polyclonal antibodies (PABs). The invention uses the PABs in 2D-PAGE immunoblotting in order to confirm the correct specificity of the antibody by co-localization or to identify unrecognized isoforms of vaccine candidates. The invention provides verification/identification of vaccine candidates by immunoblotting and co-localization as exemplified in Table III. The invention uses the PABs to determine the sub-cellular localization of vaccine candidates by means of e.g. indirect immunofluorescence microscopy.

10

15

20 The invention, therefore, also provides one of the alternative methods above which method further comprises the following steps:

- 1) obtaining antibodies against proteins from said intracellular bacteria, identified according to any of the above methods,
- 2.5 2) 2D-PAGE immunoblotting on whole cell lysates of cells infected with the bacteria using antibodies obtained in step 1),
- 3) detecting protein spots reacting in step 2),
- 4) identifying the proteins in the spots selected in step 3).

30 Combinations of the four alternative methods are also part of the invention.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

31

In preferred embodiments of the methods of the invention the labelling of the intracellular bacteria is done by radioactive means, such as [35S]cysteine, [35S]methionine, [14C]labelled amino acids or combinations thereof.

5 The method for identifying the proteins in the selected protein spots may be based on Edman degradation or any mass spectrometric method, such as MALDI TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry), ESI Q-TOF MS (Electrospray Ionisation Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry), PSD-MALDI MS (Post Source Decay  
10 MALDI Mass Spectrometry) or combinations of such methods. Further, the proteins may, prior to identification, be subjected to cleavage by chemical methods, such as cyanogen bromide treatment or hydroxylamine treatment, or by enzymatic methods with any suitable enzymes, such as trypsin, stymotrypsin, chymotrypsin, or pepsin, or combinations thereof.

15 The intracellular bacteria may be a facultative intracellular or obligate intracellular bacteria, and bacteria from the Genus *Chlamydia*, such as *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *C. psittaci* or *C. pecorum*, including any specific serovar or strain of these, are particularly interesting. However, other  
20 intracellular bacteria, such as *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* or *Listeria*, are interesting, too, in connection with the present invention.

The host cells to be used according to the invention, may be common host cells known in the art, such as an immortalized cell line, e.g. HeLa, Hep2,  
25 McCoy or U937, a primary cell line obtained from mammalian donors or by autopsy, a genetically modified cell line, or an organ cell culture, or even other cells wherein the bacteria can grow. The host cells may be treated with IFN- $\gamma$  prior to or during infection with the intracellular bacteria and/or may have been genetically modified to over-express or suppress genes which are  
30 recognized as being relevant in context of Chlamydial vaccine development.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

32

When the method of the invention uses one or more proteasome inhibitor, any known inhibitor, such as MG132, MG262, MG115, epoxyomicin, PSI and clasto-Lactacystin- $\beta$ -lactone, are relevant to use.

5 The methods of the invention are particularly interesting for identification of proteins, which either in their full length or as immunogenic fragments thereof are suitable for inclusion in immunogenic compositions and/or diagnostic purposes, especially such proteins, which comprises T-cell epitopes being candidates for presentation as MHC-class I or II, and more preferable -class I, restricted antigens suitable for inclusion in immunogenic compositions.

10

Accordingly, in another important aspect of the invention it relates to a protein identifiable by any of the claimed methods or an immunogenic fragment thereof, and preferable such proteins and fragments, which are applicable for inclusion in immunogenic compositions and/or diagnostic purposes.

15

The proteins of the invention may be proteins, which are secreted from *C. trachomatis* and *C. pneumoniae*. Such proteins are e.g. those characterized as DT1-77 as given in Table I as well as CP1-CP91 as given in Table II, respectively, having the pI and Mw values given in the Tables I and II, respectively, determined with an average error of +/- 10 %, and immunogenic fragments thereof.

20

TABLE I

Protein spot	Pi	Mw
DT1	4.45	23.5
DT2	4.55	23.5
DT3	4.55	34.5
DT4	4.75	36.1
DT5	4.83	11.4

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

33

Protein spot	Pi	Mw
DT6	9.3	9.27
DT7	4.85-4.9	24.8
DT8	5.1	7.8
DT9	4.73	23.7
DT10	4.8	23.7
DT11	4.85	23.7
DT12	4.93	23.7
DT13	6.05	24.3
DT14	6.2	27.5
DT15	6.1	32.4
DT16	5.98	39
DT17	6.28	55.2
DT18	6.1	41.1
DT19	6.1	47.9
DT20	7.4	37.6
DT21	7.7	34.7
DT22	8.2	22.4
DT23	4.83	30.4
DT24	5	29.5
DT25	5	12.6
DT26	4.7	10.9
DT27	5.15	13.5
DT28	5.7	31.9
DT29	4.97	54.8
DT30	5.86	36
DT31	5.78	36.2
DT32	6.4	10.4
DT33	6.3	13.3
DT34	9.5	32.4

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

34

Protein spot	Pi	Mw
DT35	8	46.5
DT36	7.49	40.6
DT37	7.15	37.6
DT38	7.24	34.5
DT39	7.44	46.5
DT40	6.4	67.2
DT41	5.04	56.4
DT42	8.5	32.9
DT43	8.5	30.5
DT44	8.66	42.6
DT45	8.85	43.1
DT46	4.4	87.6
DT47	5.4	41
DT48	7.36	24.2
DT49	9.25	47.4
DT50	5.0	94
DT51	5.35	100.5
DT52	5.41	59.7
DT53	5.97	23
DT54	6.12	25.5
DT55	5.34	36.4
DT56	4.88	10.5
DT57	4.87	18.5
DT58	6.14	97
DT59	4.5	19.7
DT60	5.5	40.9
DT61	5.5	39.9
DT62	5.98	41.1
DT63	6.9	46.8

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

35

Protein spot	Pi	Mw
DT64	5.5	34.5
DT65	4.5	68.2
DT66	4.35	57.6
DT67	6.13	66.5
DT68	6	62.9
DT69	5.85	65.6
DT70	5.72	70.4
DT71	5.5	44
DT72	5.85	10.2
DT73	4.45	30.5
DT74	5.02	48.2
DT75	4.37	21.9
DT76	5.14	23.3
DT77	5.64	23.0

List of potentially secreted proteins from *C. trachomatis* D present in whole cell lysates at 24 h.p.i., but significantly reduced in EB and their estimated  
5 pi/Mw, +/- 10 % average error.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

36

TABLE II

Name	Pi	Mw
CP01	5.5	100.4
CP02	6.7	91.0
CP03	5.3	75.2
CP04	5.4	68.7
CP05	5.4	72.8
CP06	5.5	68.6
CP07	5.6	80.5
CP08	5.7	74.1
CP09	6.0	77.8
CP10	6.0	71.2
CP11	6.1	82.6
CP12	6.2	68.4
CP13	6.2	72.0
CP14	5.4	64.8
CP15	5.5	63.7
CP16	5.8	61.1
CP17	5.8	102.4
CP18	6.1	63.6
CP19	6.1	61.0
CP20	6.5	64.0
CP21	6.6	63.7
CP22	5.0	60.9
CP23	5.0	60.5
CP24	5.6	60.4
CP25	5.7	50.2
CP26	6.3	57.0
CP27	6.3	52.8

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

37

Name	Pi	Mw
CP28	6.4	48.5
CP29	4.9	50.6
CP30	5.0	48.6
CP31	4.9	473
CP32	4.7	42.1
CP33	4.9	439
CP34	5.0	39.3
CP35	5.1	42.9
CP36	5.2	42.1
CP37	5.3	40.7
CP38	5.4	40.7
CP39	5.6	40.3
CP40	5.6	41.6
CP41	5.9	41.8
CP42	6.4	38.4
CP43	6.2	44.3
CP44	6.5	45.3
CP45	6.8	45.3
CP46	4.6	38.6
CP47	4.6	37.8
CP48	5.1	35.8
CP49	5.3	38.9
CP50	5.5	38.9
CP51	5.6	33.6
CP52	5.7	33.7
CP53	5.9	34.9
CP54	6.2	34.8
CP55	6.2	34.7
CP56	6.3	34.8

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

38

Name	Pi	Mw
CP57	8.3	36.0
CP58	8.7	36.1
CP59	4.5	29.7
CP60	4.8	26.0
CP61	5.2	27.6
CP62	5.4	30.6
CP63	6.2	25.2
CP64	6.6	26.3
CP65	5.9	22.8
CP66	4.7	24.2
CP67	4.8	22.4
CP68	5.1	24.1
CP69	5.2	24.3
CP70	5.3	22.3
CP71	5.6	21.4
CP72	6.9	17.8
CP73	4.8	12.0
CP74	5.0	8.9
CP75	5.1	11.9
CP76	6.5	9.3
CP77	7.0	10.5
CP78	7.2	10.4
CP79	8.7	13.0
CP80	5.7	93.3
CP81	6.4	37.2
CP82	6.9	45.0
CP83	7.0	41.6
CP84	7.1	38.6
CP85	6.3	32.2

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

39

Name	Pi	Mw
CP86	6.4	32.0
CP87	8.8	31.3
CP88	5.0	23.8
CP89	4.7	73.0
CP90	7.4	40.1
CP91	7.8	37.7

List of potentially secreted proteins from *C. pneumoniae* present in whole cell lysates at 55 h.p.i but significantly reduced in EB and their estimated pI/Mw, +/- 10 % average error.

5

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

40

More preferred proteins of the inventions are *C. trachomatis* proteins, such as those identified by the corresponding gene number in the *Chlamydia* Genome project as CT017 (gene name CT017), CT044 (gene name ssp), CT243 (gene name lpxD), CT263 (gene name CT263), CT265 (gene name accA), CT286 (gene name clpC), CT292 (gene name dut), CT407 (gene name dksA), CT446 (gene name euo), CT460 (gene name SWIB), CT541 (gene name mip), CT610 (gene name CT610), CT650 (gene name recA), CT655 (gene name kdsA), CT668 (gene name CT668), CT691 (gene name CT691), CT734 (gene name CT734), CT783 (gene name CT783), CT858 (gene name CT858), CT875 (gene name CT875), or ORF5 (gene name ORF5), or by the protein name DT8 as given in Table IIIA, and *C. pneumoniae* proteins, such as those identified by the corresponding gene number as CPN0152 (gene name CPN0152), CPN0702, CPN0705 (gene name CPN0705), CPN0711 (gene name CPN0711), CPN0998 (gene name fitsH), CPN0104 (gene name CPN0104), CPN0495 (gene name aspC), CPN0684 (gene name parB), CPN0796 (gene name CPN0796), CPN0414 (gene name accA), CPN1016 (gene name CPN1016), CPN1040 (gene name CPN1040), CPN0079 (gene name R110), CPN0534 (gene name dksA), CPN0619 (gene name ndk), CPN0711 (gene name CPN0711), CPN0628 (gene name rs13), CPN0926 (gene name CPN0926), CPN1063 (gene name tpiS), or CPN0302 (gene name lpxD) as given in Table IIIB, and immunogenic fragments thereof.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

41

TABLE III A

Protein spot nr	Gene number*	Gene name	Methods of identification	pI	Mw
DT1	CT668	CT668	M,Q,I	4.45	23.5
DT2	CT668	CT668	M,Q,I	4.55	23.5
DT3	CT783	CT783	M,Q,I	4.55	34.5
DT4	CT858	CT858	M,Q,I	4.75	36.1
DT48	CT858	CT858	M,I	7.36	24.2
DT7	CT610	CT610	M,E,I	4.85-4.9	24.8
DT9	CT610	CT610	I	4.73	23.7
DT10	CT610	CT610	I	4.8	23.7
DT11	CT610	CT610	I	4.85	23.7
DT12	CT610	CT610	I	4.93	23.7
DT8	None	DT8*	Q,I	5.1	7.8
DT6	CT460	SWIB	M	9.3	9.27
DT14	ORF5	ORF5	M	6.2	27.5
DT22	CT446	euo	Q	8.2	22.4
DT23	CT541	mip	M	4.83	30.4
DT24	CT541	mip	M	5	29.5
DT25	CT407	dksA	M,Q	5	12.6
DT26	CT734	CT734	Q,I	4.7	10.9
DT27	CT292	dut	M,Q	5.15	13.5
DT28	CT655	kdsA	M,E	5.7	31.9
DT30	CT265	accA	M	5.86	36
DT35	CT017	CT017	M	8	46.5
DT39	CT017	CT017	M	7.44	46.5
DT36	CT243	lpxD	M	7.49	40.6
DT37	CT650	recA	M,E	7.15	37.6
DT57	CT044	ssp	M	4.87	18.5

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

42

Protein spot nr	Gene number*	Gene name	Methods of identification	pI	Mw
DT58	CT286	clpC	M	6.14	97
DT69	CT875	CT875	M	5.85	65.6
DT76	CT691	CT691	Q	5.14	23.3
DT77	CT263	CT263	Q	5.64	23.0

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

43

TABLE III B

Protein spot nr	Gene number	Gene name	Methods of identification	pI	Mw
CP34	CPN1016	CPN1016	I	5.0	39.3
CP37	CPN0998	ftsH	M	5.3	40.7
CP42	CPN0104	CPN0104	M	6.4	38.4
CP46	CPN0796	CPN0796	Q	4.6	38.6
CP47	CPN0705	CPN0705	M	4.6	37.8
CP50	CPN0495	aspC	M	5.5	38.9
CP52	CPN0152	CPN0152	M	5.7	33.7
CP55	CPN0684	parB	M	6.2	34.7
CP56	CPN0414	accA	M	6.3	34.8
CP63	CPN1016	CPN1016	M	6.2	25.2
CP71	CPN1040	CPN1040	M	5.6	21.4
CP72	CPN0079	rl10	M	4.8	12.0
CP73	CPN0534	dksA	M	5.0	8.9
CP75	CPN0619	ndk	M	5.1	11.9
CP76	CPN0711	CPN0711	M	6.5	9.3
CP78	CPN0628	rs13	M	7.2	10.4
CP79	CPN0926	CPN0926	M	8.7	13.0
CP88	CPN1063	tpiS	M	5.0	23.8
CP91	CPN0302	lpxD	M	7.8	37.7

List of examples of identified A: *C. trachomatis* D and B: *C. pneumoniae*

5 vaccine candidates. M: MALDI-MS, Q: ESI-Q-TOF MS, P: PSD-MALDI MS,

I: Western blotting.

\*: DT8 represents an expressed protein encoded by a novel open reading frame, which is not annotated in the *C. trachomatis* D genome.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

44

The proteins DT4, DT23, DT47, DT48, DT75, DT76, and DT 77 shown in Figure 10, as well as the proteins CP34, CP37, CP46, CP47, CP52, CP63, and CP75 shown in Figure 11 are of particular relevance.

Also preferred proteins of the invention are *C. trachomatis* proteins, which are proteins that have a prolonged turnover time in the presence of proteasome inhibitors, being characterised by having the pI and Mw characteristics of one of the proteins DT1, DT2, DT3, DT5, DT9, DT10, DT11, DT13, DT14, DT17, DT47, DT59, DT60, DT61 or DT62 as given in Table IV, determined with an average error of +/- 10%. Proteins from *C. pneumoniae*, which are regulated by proteasome inhibitors in the same way, are also preferred embodiments of the invention.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

45

TABLE IV

Spot nr.	Gene name	pI	Mw	Affected by MG115	Affected by MG132	Affected by PSI	Affected by epoximicin	Affected by B-clasto lactacystin
DT1	CT668	4.45	23.5	+	+			
DT2	CT668	4.55	23.5	+	+			
DT3	CT783	4.55	34.5	+	+			
DT5		4.83	11.4	+	+			
DT9	CT610	4.73	23.7	+	+			
DT10	CT610	4.8	23.7	+	+			
DT11	CT610	4.85	23.7	+	+			
DT13		6.05	24.3	+	+	+		
DT14	ORF5	6.2	27.5	+	+			
DT17		6.28	55.2	+	+			
DT47		5.4	41	+	+	+	+	
DT59		4.5	19.7	+	+			
DT60		5.5	40.9	+	+	+	+	
DT61		5.5	39.9	+	+	+	+	
DT62		5.98	41.1	+	+	+	+	

List of examples of identified *C. trachomatis* D proteins, which turnover times  
5 is prolonged by treatment with different proteasome inhibitors during labelling and chase.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

46

Another preferred protein of the invention is a *Chlamydia trachomatis* polypeptide DT8, which comprises the sequence SEQ ID NO:1 as defined in the claims and immunogenic fragments thereof.

- 5 In other preferred embodiments of this aspect of the invention the proteins have at least 40 % sequence identity, preferable at least 60 %, more preferable at least 70 %, even more preferable at least 80 %, further more preferable 90 %, and most preferable at least 95% sequence identity to the proteins or fragments thereof of the invention, or it comprises at least 7  
10 consecutive amino acids of the proteins of the invention.

In a further aspect of the invention it relates to a nucleic acid compound, which comprises a sequence that encodes a protein or an immunogenic fragment thereof according to the invention.

- 15 A preferred nucleic acid compound is one which comprises a sequence (SEQ ID NO:2) that encodes a polypeptide DT8, which comprises the sequence SEQ ID NO:1.

- 20 In yet other aspects the invention relates to a vector comprising a nucleic acid compound of the invention, as well as a host cell transformed or transfected with the vector.

- 25 The invention also provides the use of a protein or an immunogenic fragment thereof of the invention for the production of antibodies against said protein, a method for producing an antibody against intracellular bacteria, wherein a protein or an immunogenic fragment thereof of the invention are administered to a producing animal, and the antibody is purified there from, as well as an antibody obtainable by this method.

- 30 Further, the invention provides in other aspects a pharmaceutical or diagnostic composition comprising the protein or fragment thereof of the

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

47

invention, an antibody or a nucleic acid compound of the invention, as well as the use of the protein or fragment thereof, the antibody or the nucleic acid compound in the preparation of a diagnostic reagent.

5 Identification of T-cell epitopes from vaccine candidates

The invention provides T-cell epitopes, that are likely to be surface expressed as MHC class I antigens and have a T-cell stimulating effect, as predicted by computer based methods from the sequences of the proteins identified in the present invention, or experimentally determined by assays as further  
10 described in the examples.

Accordingly, another important aspect of the invention is peptide epitopes that are likely to be surface presented as MHC Class I antigens and have a T-cell stimulating effect. In accordance with this the invention provides a  
15 method for identification of T-cell epitopes on secreted proteins from intracellular bacteria, comprising steps, such as computer prediction, MHC class molecule binding assays and/or ELISPOT assays on a protein or an immunogenic fragment thereof identified by the methods of the invention, as well as the peptide epitopes. As part of this aspect the invention also  
20 provides a nucleic acid compound, which comprises a sequence that encodes said peptide epitope, as well as a vector comprising the nucleic acid compound and a host cell transformed with said vector.

Preferred peptide epitopes of the invention comprises 4 to 25 consecutive  
25 amino acids, preferably 6 to 15, and even more preferably 7 to 10 amino acids of a protein of the invention.

In a more preferred embodiment of the invention the epitopes comprises 7 to  
30 10 consecutive amino acids of a *C. trachomatis* or a *C. pneumoniae* protein.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

48

Another preferred peptide epitope of the invention is an epitope, which comprises 4 to 25 consecutive amino acids of a polypeptide comprising the sequence SEQ ID NO:1, more preferably 6 to 15 and most preferably 7 to 10 amino acids.

5

*Chlamydia trachomatis* peptide epitopes, which comprises an amino acid sequence selected from the sequences SEQ ID NO. 3 – SEQ ID NO. 45, *Chlamydia pneumonia* peptide epitopes, which comprises an amino acid sequence selected from the sequences SEQ ID NO. 46 – SEQ ID NO. 121,

10

*Chlamydia pneumonia* peptide epitopes, which comprises an amino acid sequence, selected from the sequences of SEQ ID NO. 122 – SEQ.ID NO. 148, as well as and *Chlamydia trachomatis* peptide epitopes, which comprises an amino acid sequence, selected from the sequences of SEQ ID NO. 149 – SEQ.ID NO. 194 are of particular relevance. The identified

15

epitopes of the invention are further characterized in Tables V-VIII.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

49

TABLE V

Protein ID	Position	Peptide sequence	A2 binding
CT263	181	KLAEAIFPI	8
CT263	170	FLKNNKVKL	123
CT263	56	ALSPPPSGY	210
CT263	141	FIKQASLV	210
CT263	17	TLSLFPFSL	286
CT263	147	SLVACPCSM	332
CT263	6	LIFADPAEA	386
CT263	4	LLLIFADPA	438
CT541	4	ILSWMLMFA	38
CT541	94	KQMAEVQKA	69
CT541	9	LMFAVALPI	122
CT541	135	KLQYRVVKE	221
CT541	118	FLKENKEKA	222
CT541	46	KLSRTFGHL	239
CT541	223	SLLIFEVKL	265
CT541	148	VLSGKPTAL	352
CT541	204	VLYIHPDLA	398
CT541	54	LLSRQLSRT	472
CT691	172	LLQRELMKV	9
CT691	25	STINVLFP	66
CT691	15	PLQAHLELV	114
CT691	6	SLFGQSPFA	194
CT691	212	KLAYRVSM	251
CT691	194	VLWMQIIKG	284
CT691	29	VLFPFLFSAL	298
CT691	122	FLQKTVQSF	468

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

50

CT691	8	FGQSPFAPL	480
CT858	85	VLADFIGGL	33
CT858	177	RMASLGHKV	52
CT858	92	GLNDFHAGV	90
CT858	490	FSCADFFPV	90
CT858	379	MLTDRPLEL	101
CT858	408	LLENVDTNV	121
CT858	391	RMILQDEV	132
CT858	491	SCADFFPVV	132
CT858	519	FVFNVQFPN	132
CT858	372	YLYALLSML	247
CT858	539	SLAVREHGA	288
CT858	109	YLPYTVQKS	350
CT858	219	ATIAPSIRA	358
CT858	140	LLEVDGAPV	375
CT858	512	RTAGAGGFV	384
CT858	250	SLFYSPMVP	431

Predicted epitopes from identified *C. trachomatis* proteins

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

51

TABLE VI

Protein ID	Position	Peptide sequence	A2 binding
CPN0152	6	FLVSCLFVS	18
CPN0152	135	YLRDAQTIL	28
CPN0152	237	LLIRIQDHV	48
CPN0152	100	KLGRKFAAV	51
CPN0152	266	LVSRTQQL	164
CPN0152	10	CLFSVAIGA	190
CPN0152	222	GFGPPPIIV	354
CPN0152	249	SLPTKPYIL	387
CPN0152	240	RIQDHTAN	408
CPN0152	15	AIGASAAPV	410
CPN0152	156	RLGISGFSL	444
CPN0619	64	FMVSGPVVV	31
CPN0619	73	LVLEGANAV	398
CPN0705	164	FVGANLTLV	24
CPN0705	89	CLAENAFAG	114
CPN0705	233	KIEEVQTPL	116
CPN0705	211	ALKGHQLTL	178
CPN0705	190	QMAEAADLV	358
CPN0796	583	FMGAHVAFAS	15
CPN0796	419	LLIQHSAKV	31
CPN0796	372	FLCPFQAPS	39
CPN0796	376	FQAPSPAPV	50
CPN0796	211	AMNACVNGI	86
CPN0796	548	FMGIQVLHL	112
CPN0796	74	RHAAQATGV	134
CPN0796	328	FQYADGQMV	148

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

52

CPN0796	618	SVSAMGNFV	212
CPN0796	460	FLSYRSQVH	214
CPN0796	53	FLLTAIPGS	218
CPN0796	38	VLTPWIYRK	219
CPN0796	656	SVVMNQQL	221
CPN0796	408	SLKNSQQQL	279
CPN0796	162	MLPDTLDSV	284
CPN0796	511	ALPYTEQGL	295
CPN0796	523	VLSGFGGQV	399
CPN0998	22	LLFGVVFVGV	8
CPN0998	174	SLQERYPTL	29
CPN0998	416	MLLKGQNKV	33
CPN0998	379	FTFLPIILV	53
CPN0998	754	FLGDISSGA	56
CPN0998	36	FLAGKKARV	66
CPN0998	824	LLDAAYQRA	66
CPN0998	374	YLGYLFTFL	78
CPN0998	377	YLFTFLPII	109
CPN0998	717	SLGATHFLP	124
CPN0998	96	ELIDQGHRL	134
CPN0998	381	FLPIILVLL	197
CPN0998	386	LVLLFVYLV	219
CPN0998	161	VTGPATPQL	223
CPN0998	319	SLEKQDPEV	224
CPN0998	567	ILMAATNRP	236
CPN0998	230	LTQETDTEA	237
CPN0998	823	MLLDAAYQR	238
CPN0998	639	LLNEAALLA	254
CPN0998	736	ELYDQLAVL	256

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

53

CPN0998	199	LIGKYLSPV	294
CPN0998	454	SLGGRIPKG	303
CPN0998	781	GMSPQLGNV	306
CPN0998	645	LLAARKDRT	315
CPN0998	424	VTFADVAGI	427
CPN0998	154	VLTEPLVVT	439
CPN0998	66	KIALNDNLV	470
CPN1016	5	KLGAIVFGL	7
CPN1016	135	YLGDEILEV	34
CPN1016	284	FLPTFGPIL	99
CPN1016	439	SLQNFQSV	108
CPN1016	414	FTDEQAVAV	145
CPN1016	92	SLNDYHAGI	164
CPN1016	392	RMIFTQDEV	175
CPN1016	64	TQQARLQLV	294
CPN1016	217	SLVAPLIPE	312
CPN1016	255	YMVYFWEE	358
CPN1016	576	YVEAVKTIV	389
CPN1016	395	FTQDEVSSA	444
CPN1016	516	GAGGFVFQV	491
CPN1016	464	LLGFAQVRP	498

Predicted epitopes from identified *C. pneumoniae* proteins

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

54

TABLE VII

Protein ID	Position	Peptide sequence	A2 binding
CPN0412 (CT263)	186	RLEEVSQKL	80
CPN0412 (CT263)	103	LTTDTPPVL	103
CPN0412 (CT263)	147	KLLDMEGYA	167
CPN0412 (CT263)	110	VLSEDPPII	183
CPN0412 (CT263)	62	ALQSYCQAY	215
CPN0412 (CT263)	193	KLTQTLVEL	248
CPN0412 (CT263)	81	FVGACSPFI	267
CPN0412 (CT263)	102	NLTTDTPPV	286
CPN0412 (CT263)	205	LMERAIPPK	410
CPN0661 (CT541)	103	KMAEVQKLV	46
CPN0661 (CT541)	199	ALGMQGMKE	221
CPN0661 (CT541)	54	KLSRTFGHL	239
CPN0661 (CT541)	232	LLIFEINLI	334
CPN0661 (CT541)	8	VLATVALAL	391
CPN0661 (CT541)	187	ILLPLGQTI	396
CPN0661 (CT541)	212	VLYIHPDLA	398
CPN0661 (CT541)	7	LVLATVALA	413
CPN0681 (CT691)	29	YMLPIFTAL	40
CPN0681 (CT691)	136	LLHEFNQLL	66
CPN0681 (CT691)	172	VLQRELMQI	91
CPN0681 (CT691)	15	PLQAHLEMV	169
CPN0681 (CT691)	6	RLFGQSPFA	197
CPN0681 (CT691)	73	GLFMPISRA	223
CPN0681 (CT691)	212	KLHRINMT	229
CPN0681 (CT691)	194	YWLQVIRR	322
CPN0681 (CT691)	135	TLLHEFNQL	474
CPN0681 (CT691)	8	FGQSPFAPL	480

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

55

Predicted epitopes from *C. pneumoniae* homologs to identified *C. trachomatis* proteins

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

56

TABLE VIII

Protein ID	Position	Peptide sequence	A2 binding
CT149 (CPN0152)	274	FLGAAPAQM	17
CT149 (CPN0152)	237	FLGIQDHIL	29
CT149 (CPN0152)	101	LLTANGIAV	31
CT149 (CPN0152)	248	SLPRRIPVL	86
CT149 (CPN0152)	42	GLQEHCRCGV	107
CT149 (CPN0152)	160	SLGCHTTIH	170
CT149 (CPN0152)	307	ILTHFQSNL	181
CT149 (CPN0152)	52	VLSCGYNLV	202
CT149 (CPN0152)	195	LLKEICATI	248
CT149 (CPN0152)	272	RLFLGAAPA	318
CT149 (CPN0152)	141	ATVAKYPEV	338
CT149 (CPN0152)	11	LLSGSGFAA	343
CT149 (CPN0152)	102	LTANGIAVA	373
CT149 (CPN0152)	15	SGFAAPVEV	397
CT500 (CPN0619)	64	FMISGPVVV	20
CT500 (CPN0619)	103	ALFGESIGV	121
CT500 (CPN0619)	119	SLENAAIEV	212
CT500 (CPN0619)	87	LMGATNPKE	313
CT500 (CPN0619)	31	RIAAMKMH	385
CT671 (CPN0705)	102	ALVETPMVA	13
CT671 (CPN0705)	167	FCCANLTLV	49
CT671 (CPN0705)	214	SLKARQLNL	151
CT671 (CPN0705)	193	QLTEATQLV	239
CT671 (CPN0705)	127	DLQWVEQLV	403
CT671 (CPN0705)	155	IVLDNSNTV	423
CT841 (CPN0998)	22	LLFGVIFGV	9
CT841 (CPN0998)	415	LLAKGQNKV	14

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

57

CT841 (CPN0998)	378	FTFMPILV	29
CT841 (CPN0998)	753	FLGDVSSGA	43
CT841 (CPN0998)	824	LLDAAYQRA	66
CT841 (CPN0998)	780	GMSDHLGTV	110
CT841 (CPN0998)	716	SLGATHFLP	124
CT841 (CPN0998)	170	NLAALENRV	153
CT841 (CPN0998)	376	YLFTFMPII	160
CT841 (CPN0998)	15	FPTAFFLL	167
CT841 (CPN0998)	566	ILMAATNRP	236
CT841 (CPN0998)	66	KTALNDNLV	244
CT841 (CPN0998)	638	LLNEALLA	254
CT841 (CPN0998)	735	ELYDQLAVL	256
CT841 (CPN0998)	318	ALEKQDPEV	264
CT841 (CPN0998)	453	SLGGRIKPG	303
CT841 (CPN0998)	380	FMPILVLL	314
CT841 (CPN0998)	644	LLAARKDRT	315
CT841 (CPN0998)	423	VTFADVAGI	427
CT841 (CPN0998)	142	YTISPRTDV	467
CT841 (CPN0998)	464	LIGAPGTGK	495

Predicted epitopes from *C. trachomatis* homologs to identified *C. pneumoniae* proteins

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

58

The peptide epitope may be part of a fusion protein or coupled to a carrier moiety.

5 A frequently used method to predict peptide binding to MHC involves motif searches. The most elaborate motif search uses entire matrices representing the extended motif of the MHC. Although the sequence independent combinatorial specificity may be correct as an average consideration, it is certainly known to be wrong for individual peptides. Furthermore, crystal structures have demonstrated that the interactions at one sub-site may affect  
10 interactions at other sub-sites.

Artificial neural networks (ANN) are particularly well suited to handle and recognize any such non-linear sequence information. Information can be trained and distributed into a computer network with input layers, hidden  
15 layers and output layer all connected in a certain structure through weighted connections. Such ANN can be trained to recognize inputs (peptides) associated with a given output (say MHC binding). Once trained, the network should recognize the complicated peptide patterns compatible with binding. Using the ANN approach, the size and quality of the training set becomes of  
20 major importance. This is particularly true for the HLA since only about 1% of a random set of peptides will bind to any given HLA.

Thus, to generate as few as 100 examples of peptide binders would, if random peptides were screened, require the synthesis and testing of about  
25 10,000 peptides. This would be a very resource demanding and laborious proposition even at this modest number of binders in the training set – and this has to be repeated for every HLA to be tested.

Accordingly, in connection with the present invention matrix predictions were  
30 used to scan the SWISS-PROT (<http://www.expasy.ch/sprot/>) database for potentially high affinity binding epitopes. A large number of these have been synthesized and tested in biochemical binding assays. As predicted, a much

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

59

higher representation of high affinity binders was obtained (about 80%).  
These data were subsequently used to train ANN.

5 For four out of four MHC class I molecules examined, the ANN performed  
better than the matrix-driven prediction. The predictions have been generated  
in a fashion, which predicts the actual binding IC50 value rather than an  
arbitrary classification into "binders" vs. "non-binders". Indeed, it has been  
possible to predict binders over a large range leading to the identification of  
high affinity binders as well as binders of lower affinity as well as non-  
10 binders.

The invention further comprises the use of a peptide epitope of the invention  
for the preparation of a vaccine, as well as a vaccine comprising a peptide  
epitope of the invention, which vaccine optionally contains acceptable  
15 excipients.

In yet another aspect of the invention it relates to the use of a protein of the  
invention, an antibody of the invention, a nucleic acid compound of the  
invention or a peptide epitope of the invention in the preparation of a  
20 pharmaceutical composition for treating or preventing infection due to an  
intracellular bacteria, such as a *Chlamydia* infection, or, alternatively, in the  
preparation of a diagnostic reagent for detecting the presence of an  
intracellular bacteria, such as *Chlamydia*, or antibodies raised against the  
intracellular bacteria.

25 The invention further provides a method of inducing an immune response in  
a human, which comprises administering to said human an immunological  
effective amount of a protein, an antibody, a nucleic acid compound or a  
peptide epitope of the invention, and especially such methods for treating or  
30 preventing infection of humans by an intracellular bacteria, such as *C.*  
*pneumoniae* or *C. trachomatis*.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

60

Finally, the invention provides methods of producing a protein or a fragment thereof of the invention or a peptide epitope of the invention, respectively, which comprises transforming, transfecting or infecting a host cell with a vector comprising a nucleic acid compound that encodes said protein or peptide epitope, and culturing the host cell under conditions, which permit the expression of said protein or fragment by the host cell.

The invention is further illustrated by the following, non-limiting examples.

#### Examples

##### Example 1:

###### 10 Infection of mammalian cell cultures

Semi-confluent HeLa, HEp-2 or McCoy (ATCC, Rockville, MD, USA) cell monolayers were infected with one inclusion forming unit (IFU) of *C. pneumoniae* VR1310, *C. trachomatis* serovar A (HAR-13), D (UW-3/Cx) or L2.(434/Bu)(ATCC) as previously described in [19.] and [17.] The infection medium consisted of RPMI 1640, 25 mM HEPES, 10% FCS, 1% w/v glutamine, 10 mg/ml gentamycin for *C. trachomatis* A and D and RPMI 1640, 25 mM HEPES, 5% FCS, 1% w/v glutamine, 10 mg/ml gentamycin for *C. trachomatis* L2.

##### Example 2:

###### 20 Pulse labelling/chase

To label chlamydial proteins for two hour periods, infected cell cultures were incubated in a medium containing RPMI 1640, 10 mg/ml gentamycin, 40 µg/ml cycloheximide, 100 µCi/ml [35S]-methionine/cysteine (Promix, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) as described previously (Shaw *et al.*, 1999,2000) [18.] [19.]. After labelling the labelling medium was changed to normal growth medium following two washes in normal growth medium and the infected cells were harvested at different points in time after

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

61

labelling. Similarly, labelled EB proteins were obtained by allowing the Chlamydia to grow until 72 h.p.i. after the two hour labelling periods. The labelled EB were then harvested and purified using two consecutive steps of density gradient ultracentrifugation essentially as described for *C.*

5 *trachomatis* in (Schacter and Wyrick, 1994) [22.]and for *C. pneumoniae* (Knudsen *et al.* 1999 [17.]). Proteins in the EB preparation and pulse chase preparation were labelled at the same intervals as proteins from the whole cell lysate preparation to facilitate correct 2D-PAGE protein profile comparison.

10

**Example 3:**Sample preparation

Following [<sup>35</sup>S]-labelling cells were washed twice in PBS and solubilised in a standard lysis buffer containing 9 M Urea, 4% w/v 3-[(3-

15 cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propanesulfonate (CHAPS; Roche, Germany), 40 mM Tris Base, 65 mM DTE and Pharmalyte 3-10 (Amersham Pharmacia Biotech). For the enrichment of high molecular weight and hydrophobic proteins 7 M urea, 2 M thiourea, 4% w/v 3-[(3-

20 Boehringer Mannheim, Germany), 40 mM Tris Base, 65 mM dithioerythretiol (DTE) and 2% vol/vol Pharmalyte 3-10 (Amersham Pharmacia Biotech) was used essentially according to (Harder *et al.* 1999 [23.]).

Samples containing whole cell lysates or purified EB were sonicated and centrifuged at 10 000 X g for 10 min. Samples were stored at -70° until

25 used.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

62

**Example 4:**Separation of Chlamydia proteins

*Chlamydia* proteins from whole cell lysates and purified EB were separated by two-dimensional gel electrophoresis essentially as described in (Shaw *et al.*, 1999,2000) [18,] [19].

For isoelectric focusing in the first dimension, 18 cm long pH 3-10 NL (non-linear), 4-7 L (linear) or 6-11 (linear) immobilized pH-gradient drystrips (Amersham Pharmacia Biotech) were reswelled with a sample amount of 200,000 counts per minute (cpm) labelled protein in 350  $\mu$ l of lysis buffer for 12 hours at 20 °C using the IPGphor™. Other strips used in the invention include ultranarrow IPG strips. The strips are described in Table IX. These allows us to focus on specific pH intervals containing proteins of interest, if necessary. The voltage during isoelectric focusing at 20° C was programmed as follows: 1 h at 300 V, 2 hours at 300-500 V (linear increase), 1 h at 1000 V, 1 h at 2000 V, 3 h at 3500 V and 5000 V at 24 h when using 3-10 NL, 4-7 L and 6-11 L drystrips.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

63

TABLE IX:

IPG strip name	Linearity	Covered pH interval	Strip length
Immobiline Drystrip pH 3-10	non-linear	3-10	18 cm
Immobiline Drystrip pH 3-10	linear	3-10	18 cm
Immobiline Drystrip pH 4-7	linear	4-7	18 cm
Immobiline Drystrip pH 6-11	linear	6-11	18 cm
Immobiline Drystrip pH 6-9	linear	6-9	18 cm
Immobiline Drystrip pH 3.5-4.5	linear	3.5-4.5	18 cm
Immobiline Drystrip pH 4-5	linear	4-5	18 cm
Immobiline Drystrip pH 4.5-5.5	linear	4.5-5.5	18 cm
Immobiline Drystrip pH 5-6	linear	5-6	18 cm
Immobiline Drystrip pH 5.5-6.7	linear	5.5-6.7	18 cm

List of examples of commercial available IPG drystrips useful in the invention

5

After the first dimension the drystrips were equilibrated in a buffer containing 6 M Urea, 30% v/v glycerol, 2% w/v DTE, 2% w/v SDS, 0.05 M Tris-HCl pH 6.8 for 15 min. The strips were then equilibrated for additionally 15 min. in a buffer in which DTE was replaced by 2.5% w/v iodacetamide. For the second

10

dimension, the Protean II xi Multicell system (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) was used to separate proteins on 9- 16% linear gradient SDS-PAGE gels (18 cm X 20 cm X 1 mm). Analytical gels were fixed in a solution containing 10% acetic acid and 25% 2-Propanol for 30 min. and treated with Amplify (Amersham Pharmacia Biotech) for 30 min. Labelled proteins were visualized by

15

autoradiography after 8- 10 days exposure of Kodak Biomax-MR film (Amersham Pharmacia Biotech) at -70°C.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

64

Figure 1A shows an example of an autoradiography of a high resolution analytical 3-10 IPG 2D-gel (standard lysis buffer was used) of *C. trachomatis* D proteins labelled from 22-24 h.p.i. Figure 2A shows an example on an autoradiography of a 3-10 IPG 2D-gel (thiourea containing lysis buffer was used) of *C. Pneumoniae* proteins labelled from 55-57 h.p.i. A total of approximately 600 protein spots could be visualized on each gel as estimated by means of the Melanie II software.

To prepare samples for analysis by mass spectrometry, 2D gels were run with 500-1000  $\mu$ g of whole cell lysates. To visualize proteins on preparative gels on X-ray films  $2 \times 10^8$  cpm of [ $^{35}$ S]-protein labelled protein from cells grown in parallel with the unlabelled samples was run on the same gels. Preparative gels were washed for 10 min. in ddH<sub>2</sub>O and dried un-fixed. Radioactive ink was used to mark anchor spots on the sides of the gels, so that an exact matching of the dried gel and the corresponding X-ray-film could be performed after exposure. Proteins of interest were excised and pooled together from minimum three identical gels. Gels using narrow or ultra-narrow drystrips (Table IX) were used to increase the separation distance, if host cell contamination was a problem in the mass spectrometric identification.

**Example 5:**Identification of vaccine candidates using MALDI MS, ESI-Q-TOF MS, PSD MALDI MS and Edman degradation

Protein spots from preparative gels of whole cell lysates representing vaccine candidates were subjected to in-gel digestion with trypsin. The resulting peptides were purified using reverse phased columns (Gobom *et al.*, 1999 [20.]) or beads (Gevaert *et al.*, 1997 [21.]) consisting of Poros R2 material. The samples were subsequently analyzed using a Bruker REFLEX MALDI time of flight mass spectrometer (Bruker-Daltonik, GmbH, Bremen, Germany) operating in reflectron mode. The resulting masses were compared to

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

65

peptide masses generated by a theoretical tryptic cleavage of proteins present in databases by peptide mapping as described previously (Schevchenko 1996 [24.]).

- 5 An example of an identification of DT1 as CT668 using MALDI-MS is shown in Figure 3. Figure 3A shows the peptide mass fingerprint obtained by an MALDI mass spectrometer. Obtained masses were matched to theoretical tryptic cleavage products of all proteins present in databases using the Prospector software MS-Fit. If the search was restricted to a pI/Mw area in  
10 proximity to the protein found on the gels the highest-ranking protein was CT668 (Figure 3B). However, as proteins from the host cell are sometimes present in the spots from gels with whole cell lysates identification may be unambiguous. Therefore, tandem mass spectrometry and post source decay (PSD) analysis was used to verify the results, if necessary (Reviewed in  
15 Mann and Wilm, 1995 [25.], Gevaert, 1997 [21.]).

- Tandem mass spectrometry of peptides generated by in-gel digestion was performed on an Electrospray Ionization Quadrupole Time-Of-Flight (ESI-Q-TOF) mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK). Using this method a single ionized peptide can be isolated from the sample. Through  
20 fragmentation of this parent ion by collision with a gaseous atmosphere several new ions were generated and recorded in a new peptide mass fingerprint. These new ions were distinguished in size by only one amino acid, thus providing details of the amino acid sequence of the original peptide (Mann and Wilm, 1995) [25.].

- 25 Figure 4A shows an example of a fragmented peptide parent ion from DT1, yielding a sequence, which through database search using BLAST or MS-Tag were found to correspond to fragments of CT668. Sequence tags arising from the human progesterone binding protein were also identified from the CT668 sample.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

66

Peptides from this protein could also be detected in the MALDI MS peptide mass fingerprint (double headed arrows, Fig 3A) if the search was restricted to human proteins. This shows that problematic spots, which contain more than one protein, can be unambiguously identified by ESI-Q-TOF, thus  
5 conforming problematic MALDI MS identification.

Another approach used in the invention to confirm MALDI results was PSD. PSD utilizes that peptides undergo metastable decay after ionization meaning that peptide fragments of the same velocity have different mass and therefore possess different kinetic energy. The differences in kinetic energy  
10 can be resolved by reflecting the fragments in a magnetic field. High energy fragments will penetrate further into the magnetic field than low energy fragments and thereby be delayed. The spectra resulting from fractionation of a single peptide can be used to deduce the amino acid sequence of a peptide sequence tag (PST)(Mann et al, 1993) [28.] as fragmentation  
15 predominantly occurs at the peptide bonds. PSTs can be matched against protein databases and thereby the protein from which they originate can be identified (Wilkins et al, 1996 [27.]).

An example of the identification of spot no. CP63 as CPN1016 through PSD MALDI MS is shown in Fig 4B. From a total of 36 observed masses in the  
20 PSD spectra 16 could be matched within one mass unit to masses originating from a theoretical fragmentation of the peptide with the sequence of the 1919.80 Da parent ion (R)ELLFGWDLSSQTQQAR(L), which matched the CPN1016 protein from *C. pneumoniae*.

25 Using mass spectrometric approaches, examples of the identification of *C. trachomatis* D (Table IIIA) and *C. pneumoniae* (Table IIIB) vaccine candidates are provided. Mw and Pi values were determined electrophoretically with an average error of +/- 10%.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

67

CT858 had a theoretical Mw of 67 kDa, thus indicating that the protein identified was a processed fragment of a larger protein. Indeed all three peptides from ESI-Q-TOF analysis of DT4 was located in the C-terminal part of the protein.

5

Another spot, DT48, located in the basic region of the gel also contained CT858. All the peptides identifying DT48 as CT858 was matching the N-terminal part of the protein suggesting that DT48 represents the N-terminal fragment of CT858.

10

CT610 was identified from EBs by both MALDI MS and Edman degradation in both *C. trachomatis* D and L2. However, the protein was significantly reduced in EB compared to whole cell lysates and was therefore still considered a candidate for vaccine. The identification of CT610 by Edman degradation was done from *C. trachomatis* L2 CT610. The N-terminal was determined to be MNFLDQ, which is different from the MMEVFMNLDQ sequence predicted from the *Chlamydia* Genome Project (Stephens et al 1998b)[35].

15

DT8 was identified based on four sequence tags generated by ESI TOF MS. These sequences did not correspond to any predicted open reading frame in the *C. trachomatis* D genome [35]. However, by searching the Chlamydia genome in all 6 reading frames with BLAST significant matches could be generated for all four sequence tags. Analysis of the DNA sequence encoding the peptides and their surroundings elucidated a novel open reading frame including a ribosomal binding site, which comprised a 7.2 kDa protein. The translated DNA sequence of DT8 is shown in Figure 5. This finding illustrates how mass spectrometric approaches used in this invention can identify potentially important ORFs encoding vaccine candidates, which may be neglected in large genome sequencing projects.

20

25

30

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

68

Spot CP63 from *C. pneumoniae* was identified as an N-terminal fragment of CPN1016 the *C. pneumoniae* homologue of CT858 (Figure 2 B and C, Table IIIB) indicating processing of these proteins in both Chlamydia species.

- 5 In the following examples more detailed investigations of the properties of the examples on identified proteins will be presented.

#### Example 6

10 Comparison of whole lysates of infected cells to purified RB

- C. trachomatis* or *C. pneumoniae* infected cells were labelled with [35S]-methionine/cysteine for a two-hour period in the presence of cycloheximide as described in Example 2. At the end of the labelling period the infected cells were either harvested directly in lysis buffer as described in Example 3 or used for immediate purification of chlamydia RB. The purification of RB was performed by density gradient ultracentrifugation essentially as described by Schachter and Wyrick, 1994 [22].
- 15

- In Figure 10, examples of regions from gel images of *C. trachomatis* D proteins from whole lysates of infected HeLa cells labelled from 22-24 h.p.i. are compared to corresponding regions from gel images of RB and EB purified from *C. trachomatis* D infected HeLa cells labelled from 22-24 h.p.i. Identification by mass spectrometry was obtained for DT4 (C-terminal fragment of CT858), DT48 (N-terminal fragment of CT858), DT23 (Mip),
- 25 DT76 (hypothetical protein CT691) and DT77 (hypothetical protein CT263) as listed in Table III.

- In Figure 11, examples of regions from gel images of *C. pneumoniae* infected HEP-2 cells labelled at 55-57 h.p.i. and from purified EB labelled at points in time throughout the developmental cycle are compared to corresponding regions from images of *C. pneumoniae* infected cell cultures labelled at 34-36
- 30

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

69

hpi and either harvested as whole lysates of infected cells at 36 h.p.i. or purified as RB at 36 h.p.i.

The protein spots encircled in Figure 11 were identified as follows. Figure 5 11A and E show CP34 and CP63, which have been identified as two fragments of CPN1016. Figure 11B shows CP37, which has been identified as CPN0998. Figure 11C shows CP46 and CP47, which have been identified as CPN0796 and CPN0705, respectively. Figure 11D shows CP52 which has been identified as CPN0152. Figure 11F shows CP75 which has been 10 identified as CPN0619.

**Example 7:**Detection and identification of proteins located in type III secretion gene subclusters

Whereas the type III secretion genes in most intracellular bacteria are located 15 in one gene cluster as a pathogenesis island, the Chlamydia type III secretion genes have been identified in three different subclusters located in different places in the genome in both *C. trachomatis* and *C. pneumoniae* (Stephens *et al.*, 1998 [4.] and Kalman *et al.* 1999 [5.]). As part of a global proteomic analysis of *C. trachomatis* A,D and L2 and *C. pneumoniae* 20 VR1310, proteins which were present in the Type III secretion clusters were identified from gels run with purified EB.

Identified type III secretion proteins from *C. trachomatis* include the Yop secretion ATPase (yscN), the Yop translocator proteins L (YscL) and the 25 secretion chaperone (SycE) necessary for the transport of proteins from the bacterial cytoplasm to the secretion machinery. Additionally identified *C. trachomatis* D proteins, which have unknown functions but are located in type III secretion subclusters, include CT560 and the abundant CT577 and CT579. CT668, is clearly present in whole cell lysates, but absent from

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

70

purified EB, and due to its localization next to YscN, this protein may be secreted. The genomic location of the proteins is shown in Figure 9.

For *C. pneumoniae* the type III secretion apparatus proteins LcrE (CPN0324), YscC (CPN0702), YscN (CPN0707) and YscL (CPN0826) have been identified. YscC (CP89 Figure II, Table II) is absent from purified EB, probably due to localization in the inclusion membrane, where it is exposed to the host cell cytoplasm. Two proteins present in a type III cluster located around YscC (CPN0702) and YscN (CPN0707) were detected in considerably higher amount in whole cell lysates than in purified EB. These were CPN0705 (CP90, Figure II, Table II) and CPN0711 (CP76, Figure II, Table II). These proteins may also be located in the inclusion membrane or present in the host cell cytoplasm and in both cases these proteins may be accessible for the proteasome.

15 **Example 8:**

Pulse chase studies of candidates for secreted proteins

In order to estimate the time in which the identified candidate proteins could be present inside infected cells, the invention provides a series of pulse chase studies. In the following examples infected cell cultures were [<sup>35</sup>S]-labelled from 22-24 hours. After the labelling period the medium was changed to normal RPMI growth medium without [<sup>35</sup>S]-methionine and cells were harvested at different times after labelling. Results from several independent studies showed minor variation, probably due to small differences in the host cell density and/or the efficiency of infection.

25 Figure 1 B,C,D and E provides an example of a pulse/chase experiment. The intensities of CT668 and DT8 (Figure 1: A, B, respectively) were significantly decreased 1.5 hours after synthesis and virtually absent from the gels at 4.5 hours and until the EB stage. CT610 and CT783 (Fig 1: C, D) decreased significantly, but was still detectable at 4.5 hours and until the EB stage. The

30

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

71

C-terminal fragment of CT858 (D) (and the N-terminal fragment of CT858) was gradually increased during the first chase periods, but absent from EB, suggesting that the cleavage product accumulated during the Chlamydial development. The N-terminal fragment of the *C. pneumoniae* homologue of CT858, CPN1016 was also absent from EB (Figure 2)

**Example 9:**Pulse chase studies in combination with proteasome inhibitors

This example shows how to determine which of the vaccine candidates that are processed in the proteasome. Cell permeable proteasome inhibitors are added to the infected cell cultures during the labelling and chase period and the turnover time of proteins compared to that observed for labelling/chase without proteasome inhibitors added. An example of the importance of this approach is shown in Fig 6. Proteins were labelled in the presence or absence of 10-100  $\mu$ M of the proteasome inhibitor MG-132 from 22-24 h.p.i. The labelling medium was then replaced with growth medium with or without MG132 after two washes in normal growth medium and chased from 24 h.p.i. to 28 h.p.i. Cell lysates were run on 2D-PAGE(IPG) and compared to controls without MG-132. and to gels with proteins harvested immediately after labelling (Fig 6A, B and C). The invention provides examples of fifteen *C. trachomatis* D proteins, which had an increased turnover time due to treatment with proteasome inhibitors.

The levels of DT9, DT10 and DT11 were actually higher in chased+MG132 gels than in controls harvested immediately after the labelling period. This indicates, that DT9, DT10 and DT11 are very rapidly degraded by the proteasome. In contrast the levels of DT7 were not significantly affected by the addition of proteasome inhibitors.

The invention includes the use of several other proteasome inhibitors (e.g. MG115, MG262, PSI and lactocystein), which inhibit different parts of the

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

72

catalytic activity of the proteasome, which may elucidate other proteins that are degraded in the proteasome (Table IV).

**Example 10:**

5

Using genetically altered cell lines to assay the effect of proteasome inhibitor on the turnover time of *Chlamydia* proteins.

10 The invention also provides the use of the commercially available mouse embryonal cell lines MEC-PA28 cell line PW8875. MEC-PA28 is transfected with the IFN- $\gamma$  inducible PA28 alpha and beta subunit of the proteasome and MEC217 cell line is transfected with IFN- $\gamma$  inducible LMP2, LMP7 and MECL of the proteasome. MEC-PA28 and MEC217 is grown to semi confluence and infected with *C. trachomatis* or *C. pneumoniae*. Control mouse embryonal cell lines, which is not transfected with the proteasome subunits, were infected in parallel.

20 As the transfected genes encoding the overexpressed subunits from the cell lines MEC-PA28 and MEC217 are essential for the processing and presentation of MHC class I antigens the experimental procedures using proteasome inhibitors combined with pulse labelling/chase is performed with these host cell as mentioned previously.

**Example 11:**

25 Cloning and expression of open reading frames (ORFs) encoding vaccine candidates

Cloning and expression of the ORFs encoding vaccine candidates was done using the pET-30 LIC Vector Kit (Novagen, Madison, USA) in accordance with the instructions of the manufacturer.

30

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

73

The primers used for PCR of the genes had the following 5' end and 3'-end LIC overhangs:

Forward primer: 5' GACGACGACAAGATX- gene specific sequence 3'

- 5 Reverse primer: 5' GAGGAGAAGCCCGGT-gene specific sequence 3'.  
(X: the first nucleotide of the insert specific sequence)

- Either full-length genes or genes without the leader sequence were amplified by PCR using the Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR (Roche, Germany). Thirty-five  
10 PCR-cycles were performed on a DNA Thermal Cycler (GeneAmp PCR system 9600, Perkin Elmer) as follows: 15 s at 92°C (denaturation), 15 s at 55°C (primer annealing) and 4 min. at 68°C (extension). The resulting PCR products included the LIC-overhang proximal to the gene specific sequence. The PCR products were Wizard (Promega, Madison, USA) purified and  
15 ligated into the pET-30 vector. The pET-30 vector contains the gene encoding kanamycine resistance and a Histidine tag upstream of the LIC cloning site.

- pET-30 vectors containing the candidate genes were transformed into  
20 competent *E. coli* Nova Blue strain. Colonies were selected on kanamycin agar plates, and control PCR on selected colonies was performed using a vector specific primer and an insert specific primer. Plasmid DNA was purified from positive colonies containing the candidate gene specific insert. The plasmid DNA was subsequently transformed into *E. coli*(BL21). Insert  
25 positive colonies were selected on kanamycin agar plates. Expression of the fusion protein comprising the gene specific insert including an N-terminal located histidine tag, was induced in 500 ml LB-medium by addition of 1 mM IPTG (Apollo Scientific, GB).

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

74

*E. coli* (BL21) expressing recombinant fusion proteins of CT668, CT858, CT783, CT610, YscN and DT8 from *C. trachomatis* D and CPN1016 and YscC from *C. pneumoniae* VR1310 were generated.

- 5 The recombinant fusion proteins were purified from lysed bacteria using a nickel resin column (High Trap Sepharose, Amersham Pharmacia Biotech) as previously described. Coomassie stained SDS-PAGE gels of the purified proteins were run. Coomassie stained bands representing fusion proteins was unambiguously identified by MALDI MS to verify that the correct fusion  
10 protein had been generated. Sera containing polyclonal antibodies were obtained by immunizing New Zealand White rabbits intramuscularly three times with 50 µg of fusion protein dissolved in Freund's adjuvant and intravenously twice with 50 µg of fusion protein dissolved in PBS as described in [17] by Knudsen et al.

15 **Example 12:**

Western blotting using PABs against vaccine candidates

- In order to confirm that the PABs recognized the correct vaccine candidates and to visualize potential post translational modifications or processing, 2D-PAGE immunoblotting were performed. 500 µg unlabelled and 2 X 10<sup>6</sup> cpm  
20 labelled *C. trachomatis* D or *C. pneumoniae* protein from whole cell lysates was separated by 2D-PAGE, and proteins were electroblotted on to PVDF membranes. Immunostaining was carried out using a 1/500-1/1000 dilution of the PABs in a buffer containing 150 mM NaCl (or in high salt, 400 mM), 20 mM Tris, 0.2% w/v gelatin, 0.05% v/v Tween 20 (Bio-Rad) and 2% v/v normal  
25 goat serum (Dako, Glostrup Denmark).

- The secondary antibody used was alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad) diluted 1/2000 in antibody buffer. Blots were stained with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate toluidium (BCIP)/nitroblue tetrazolium (NBT) (Bio-Rad) until a clear reaction was detected. Immunoblots  
30

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

75

were computer scanned and subsequently exposed to X-ray films for approximately 8 days. Melanie II Software was used in order to compare immunostained proteins with their [35S]-labelled counterparts.

- 5 In Figure 7A1 and 7A2 an example of a total 2D-PAGE IMB image with PAb245 against CT858 is shown. PAb 245 reacts reproducibly with DT4 (CT858 C-terminal fragment) and DT48 (CT858 N-terminal fragment) (Fig 7A1) as indicated from the corresponding labelled background (Fig 7A2).
- 10 Figure 7B1 and 7B4 shows IMB with CT668 and YscN. Immunoreactive protein spots on the gel and their localization based on a labelled background (Fig 7B2 and B5) corresponded to the positions of the proteins on analytical gels (Figure 7 B3 and B6), thus confirming that the PABs reacted with the correct proteins.
- 15 The invention provides an example of IMB showing that levels of certain isoforms of CT610 are clearly increased in MG132 treated infected cells compared to non-treated controls. DT7 was identified as CT610 and was located just above DT9, DT10, DT11 and DT12 (Fig 6A). IMB with PAb255
- 20 against CT610 on 2D-gel blots (Fig 7C1) of whole cell lysates clearly reacted with two rows of spots, one row representing DT7 and the other row representing DT9, DT10, DT11 and DT12. CT610 is therefore present in different isoforms presumably due to different posttranslational modification and processing. The abundance of DT9, DT10 and DT11 was clearly
- 25 increased if cells were treated with the proteasome inhibitor MG132 (Fig 7 C2).
- IMB with PAb255 was performed on ordinary SDS-PAGE PVDF blots with protein from whole cell lysates treated for six hours in the presence or
- 30 absence of MG132, respectively. Fig 7 C4, clearly shows an extra band below the band representing the DT7 row of spots in lanes containing

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

76

proteins from MG132 treated infected cells (lane b and d) compared to untreated controls (lane a and c). The levels of the upper band, representing the DT7 row, was not significantly altered by the proteasome inhibitor treatment.

5 **Example 13:**

Expression of candidates in different *C. trachomatis* serovars and upon growth in different host cells

The invention considers serovar/host cell specific differences in expression levels of potentially secreted proteins, as host cell/Chlamydia interactions may be different for other serovars or by cultivation in other host cells. This is relevant for the choice of the vaccine candidate with greatest potential for a general *C. trachomatis* vaccine.

CT668, CT858, CT783 and CT610 were all detected at the same positions in *C. trachomatis* A, D and L2. This is in agreement with the very high conservation of the genes encoding these proteins between *C. trachomatis* D and L2. In addition, all of the proteins were expressed when *C. trachomatis* A, D and L2 was cultivated in McCoy or Hep-2 cells instead of HeLa cells, indicating that the expression of these proteins is independent of cell types used. However, based on gels with Chlamydia protein labelled from 22- 24 h.p.i. or 34-36 h.p.i. DT8 was detectable at pI 5.1 and Mw 7.5 in serovars A and D. However, in serovar L2 DT8 was detected at pI 6.4 Mw 7.5 presumably due to minor amino acid substitutions which alter the net charge and isoelectric point of the protein.

25

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

77

**Example 14:**Indirect immunofluorescence microscopy of vaccine candidates

Wells with glass cover slips containing semiconfluent HeLa cell monolayers were infected with *C. pneumoniae* or *C. trachomatis* D. A low titer of Chlamydia was used so that only approximately 50% of the cells was infected, thus making it possible to clearly discriminate between infected and un-infected cells. Cells were washed twice in PBS and fixed in formaldehyde or methanol at different h.p.i. and subjected to indirect immunofluorescence microscopy. If necessary PABs were pre-absorbed by acetone precipitated HeLa protein in order to obtain minimum cross reaction to human proteins.

In the example shown in Fig 8, a 1/200 dilution of pre-absorbed rabbit PAB and a 1/25 dilution of mouse monoclonal antibody directed against *C. trachomatis* MOMP (MAb 32.3) or MAb18.3 against *C. pneumoniae* was used. Fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC) goat anti-rabbit (GAR) IgG antibody and rhodamine conjugated goat anti-mouse (GAM) IgG antibody (Jackson, Trichem, Denmark) was used as secondary antibodies. The double immunostaining were performed in order to determine the sub-cellular localization of the vaccine candidates relative to the Chlamydial inclusion.

PAb 249 directed against DT8, which had a short turnover time, reacted weakly with RB in the Chlamydial inclusion (Figure 8 A3). No significant reaction to host cell structures were detected beyond the inclusion despite minimal cross reaction with HeLa cell proteins.

In contrast, CT858 clearly stained the host cell cytoplasm in infected but not un-infected cells (Figure 8 B3). In general, the staining was more intense at the borders of the inclusions. The staining of the host cell cytoplasm could be visualized from 12 h.p.i to 72 h.p.i. in agreement with the long turnover time

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

78

predicted by the pulse chase studies. The same characteristics of reaction were observed when the PAb raised against *C. pneumoniae* CPN1016 which is homolog to CT858 was reacted with *C. pneumoniae* infected Hep-2 cells.

#### Description of examples on identified proteins

##### 5 Example 15:

###### Spot number CT668 (DT1 and DT2)

CT668 was placed immediately upstream of the YscN ATPase in one of the subclusters containing genes with homology to Type III secretion genes and did not contain a predicted recognizable signal peptidase cleavage site.

10 CT668 was only present in *C. trachomatis* D for approximately 4-6 hours during which it steadily decreased in abundance. PAb against CT668 only seems to react weakly with the RB in the inclusion in IMF, but considering the short turnover time of this protein, this may be explained by a fast degradation in the host cell. CT668 has been detected from 12-40 h.p.i.,  
15 which suggests that the protein is produced during most of the intracellular development. It may therefore be that *C. trachomatis* is exporting CT668 continuously to the host cell, where it exerts its action and is rapidly degraded.

20 Two variants of CT668 were identified. The basic variant was most abundant on gels with *C. trachomatis* proteins labelled from 22-24 h.p.i and subsequently harvested. Interestingly, the intensity of the acidic variant increased and the basic variant decreased with time in all studies performed. When CT668 was chased in 30 min. intervals the increase of the acidic  
25 variant was detectable already at one hour (Figure 1B).

This finding may suggest that the modification is not due to the running conditions of the gel, which can create modifications such as carbamylation or amidation. Instead the modification seems exclusively to originate through  
30 an unknown enzyme, which modifies the protein.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

79

- Modification of secreted proteins has been described in *C. psittaci*, where IncA is phosphorylated by a host cell Ser /Thr kinase after translocation to the inclusion membrane (Rockey *et al.*, 1997) [29]. The turnover time of
- 5 CT668 was prolonged upon treatment with proteasome inhibitor, suggesting that at least limited amounts of the CT668 produced may be processed in the proteasome.

**Example 16:**10 Spot number DT8(DT8)

- DT8 is a novel 7.2 kDa protein, which based on homology search is a *C. trachomatis* specific protein. PSORT analysis indicated no recognizable leader sequence for this protein. The theoretical coordinates pI 5.21 / 7.2 kDa were in excellent agreement with the experimentally determined. Many of the
- 15 features recognized for CT668 were observed for DT8, as well. A short turnover time of < 6 hours was observed and IMF showed only a weak reaction with RB.

- After the stop codon in DT8 a potential stem-loop region can be predicted
- 20 indicating a Rho-independent transcription termination of the protein.

**Example 17:**Spot number DT7, DT 9, DT10, DT11, DT12 (CT610)

- CT610 was not located near any genes with homology to genes which are
- 25 involved in secretion in other organisms. The protein was identified from both whole cell lysates and EB, but by means of the Melanie II Software was estimated to be at least 30 times more abundant in whole cell lysates. The protein was detected in several isoforms represented by two molecular weight polymorphisms as determined by means of the Pab255 raised against
- 30 CT610. These rows of spots represented DT7(upper row) and DT9,10,11,12(lower row). Both these row had a short turnover time in the

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

80

pulse chase studies. Interestingly, the abundance of DT9, DT10 and DT11 was significantly increased upon treatment with proteasome inhibitor based on pulse chase/MG132 studies. The pulse chase studies were verified by SDS PAGE IMB with Pab255.

5

Thus, the invention provides evidence that certain isoforms of CT610 are secreted and processed in the proteasome. The different fate of the CT610 isoforms shows the relevance of using Pab raised against vaccine candidates to detect such isoforms.

10

**Example 18:**Spot number DT3 (CT783)

CT783 has been suggested to be a *C. trachomatis* protein disulfide bond isomerase. CT783 show homology to thioredoxin disulfide isomerase (CT780), and to a protein disulfide isomerase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. A 33 amino acid leader sequence can be predicted by PSORT and SignalP, and the theoretical pI and molecular weight of the cleaved protein was in agreement with the one experimentally determined. In addition polyclonal antibodies generated against CT783 stained the correct spot in 2D-PAGE IMB using 4-7 L IPG.

20

Due to the cleavage of the N-terminal leader sequence, this protein is probably not secreted via the Type I or III systems, but more likely the Type II system. A weak PSORT prediction suggested a sub-cellular localization in the bacterial inner membrane, although most PDI are normally located in the periplasm. CT783 had a very short turnover time and is virtually absent in the Chlamydia after approximately 4-6 hours chase following synthesis.

25

The turnover time of CT783 was prolonged by proteasome inhibitors suggesting a potential processing in the proteasome.

30

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

81

**Example 19:**Spot number DT4 and DT48 (CT858) and CP63 (CPN1016)

CT858 had a cleavable N-terminal leader sequence and was predicted to be a 67 kDa periplasmic protein, but was identified at two different positions on the gels. The sequence tags, which identified DT4 as CT858 all matched the C-terminal part of CT858. In IMB on 2D-PAGE PVDF membrane with whole cell lysates PAb245 reacts clearly and reproducibly with this C-terminal fragment. In addition Pab245 reacted with the protein spot DT48, which also has a long turnover time in the pulse chase studies as seen for DT4.

10

DT48 was also identified as an N-terminal fragment of CT858 by MALDI MS. The molecular coordinates of DT48 were pI 7.3/ Mw 25.8. The N-terminal part of CT858 yields a peptide with the coordinates agreeable with the one determined experimentally using the pI/Mw tool on different lengths of the N-terminal (without the signal peptide). This analysis suggests a cleavage site around K<sup>233</sup>S<sup>234</sup>M<sup>235</sup>.

15

The fact that the N-terminal and C-terminal fragment of CT858 can be detected on 2D-gels all the way up to the EB stage (72 h.p.i.), but not in purified EB is indicative of a long turnover time in the host cell cytoplasm. This was in agreement with the very clear detection of CT858 in the host cell cytoplasm up to 72 hours by IMF studies. CT858 showed weak homology to the tail-specific protease (tsp) from *E. coli*, which has been involved in the processing of penicillin binding proteins and includes a IRBP domain from human interphotoreceptor retinoid-binding proteins, which bind hydrophobic ligands (Silber *et al.*, 1992) [32]. Type II secretion has been linked to the export of degradative proteins in several gram negative bacteria including *P. aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila* (Reviewed in Hobbs and Mattick, 1993) [33.] In *Aeromonas hydrophila* a secreted elastase (ahpB) has recently been suggested to be important for the virulence of the organism (Cascon *et al.*, 2000) [34].

20

25

30

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

82

These proteins has similar fates as CT858. They are mostly synthesized as a propeptide with a cleavable signal peptide and then processed to a mature protein. Another *C. trachomatis* protein, which also shows homology to tail-specific protease, is the hypothetical protein CT441. It remains to be determined whether this protein may show the same secretory characteristics as CT858.

The same sub-cellular localization of CT858 was observed for the *C. pneumoniae* homolog, CPN1016 with Pab253 against CPN1016, thus indicating a functional conservation of this gene between the two Chlamydia species.

**Example 20:**

The secreted *C. trachomatis* D and *C. pneumoniae* proteins, which were identified by their gene number, were analysed by an ANN trained to recognize peptides with affinity for the human HLA-A2. In Tables V-VIII peptides selected by the ANN for predicted binding to HLA-A2 are listed and the affinity (Kd) is given in nM. The lower the value the better. Most peptides with Kd below 50 nM are immunogenic. Peptides with Kd below 500 nM (but above 50 nM) are potentially immunogenic. The binding of a given peptide may be improved by substitution of a sub optimal amino acid in the anchor positions P2 or P9 - a strategy that often will retain the specificity directed against the natural peptide.

**Example 21:**

Determination of the ability of a vaccine candidate to generate specific cytotoxic CD8+ T- cells in experimental animal models.

In one approach the vaccine candidates are used as full length recombinant proteins to immunize experimental animals (mouse or guinea pig) including transgenic A2 mice expressing human HLA class I molecules.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

83

In another approach the vaccine candidates are screened for T-cell epitopes by computer algorithms and subsequently peptides encompassing these epitopes are synthesized and used for immunization as described for full length vaccine candidates.

In a third approach 8-10 amino acids long peptides are synthesized, in an overlapping way so that they cover the entire sequence of a vaccine candidate, and used for MHC class I binding assay in competition with radio labelled intermediate binders. Peptide, which are good binders are used for immunization as described for full length vaccine candidates.

The vaccine candidates are administrated either as combinations of peptides/proteins or as single peptides/proteins in adjuvant. The vaccine candidates can also be administrated as a DNA-vaccine or by a virus expressing the vaccine candidate.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from the immunized animals are purified by density gradient centrifugation and CD8+ cells are purified by use of antibodies bound to magnetic beads or by other methods. CD8+ T-cell activity is measured by proliferation assays such as ELISPOT and incorporation of tritiated thymidine and by specific lysis assays (chrome release).

Purified PBMC or CD8+ cells from immunized animals are plated on microtiter plates, in limiting dilution, with irradiated antigen presenting cells, growth factors and a specific or non-specific stimulator. For specific stimulation single vaccine candidate proteins or peptides, which has been predicted as a good T-cell epitopes or found to be a good binders to the MHC class I molecule are used. For non-specific stimulation *Chlamydia* infected cells are used. The cells are cultured for 9-14 days during which antigen

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

84

specific cells proliferate. Generation of specific cytotoxic CD8+ T-cells is determined by measuring the cytokine secretion from stimulated cells with the ELISPOT assay. The proliferation of T-cells is measured by incorporation of tritiated thymidine followed by scintillation counting. The cytotoxicity of the proliferated cells is measured using a cytotoxic assay as the chromium-release assay using *Chlamydia* infected cells or recombinant cells expressing the vaccine candidate protein/peptide as target cells [42].

**Example 21**

10 Testing of the vaccine candidates for the ability to protect mice and guinea pigs against *Chlamydia* infection.

Experimental animals are immunized (as described above) with the vaccine candidates as single proteins/peptides or with a combination of vaccine candidates. Following immunization, the animals are experimentally infected 15 with *Chlamydia* (intra nasal infection for *C. pneumoniae* and genital infection for *C. trachomatis*. Protection against infection is measured by cultivation of the *Chlamydia*, immunohistochemistry, quantitative PCR and by investigation of seroconversion upon infection.

**Example 23:**

20 Determination of the ability of *Chlamydia* infection to generate vaccine candidate-specific cytotoxic CD8+ T-cells in humans.

Human serum samples are tested by ELISA (Medac) for the presence of antibodies to Chlamydia. Sero-positive individuals are selected for the 25 presence of vaccine candidate-specific cytotoxic CD8+ T-cells.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from humans who are tested antibody positive for Chlamydia are purified by density gradient centrifugation and CD8+ cell are purified by use of antibodies and magnetic beads or other 30 method. CD8+ T-cell activity specifically directed against vaccine candidate proteins/peptides is measured by the methods described in example 19.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

85

**Example 24**

Using the vaccine candidates for the developments of a ELISA test for diagnostic purposes

- 5 As the secreted proteins in the present invention are not present or significantly reduced in the purified microorganisms, immuno assay based on purified elementary bodies cannot detect antibodies to such proteins. Therefore secreted proteins can represent unrecognised major antigens, which are also involved in the humoral immune response. In addition an
- 10 ELISA based on secreted *Chlamydia* proteins may detect persistent infection with *Chlamydia* as the secreted proteins are only expressed during the intracellular stage of *Chlamydia* development.
- 1) The secreted proteins are produced as recombinant proteins, which are
- 15 purified. Alternatively overlapping synthetic peptides representing the secreted proteins are also produced.
- 2) ELISA plates are coated with purified recombinant proteins representing secreted proteins (or synthetic peptides originating from the secreted
- 20 proteins). The ELISA plate is blocked with 15% foetal calf serum to avoid unspecific binding
- 3) Patient sera are screened for antibodies against *C. Trachomatis* or *C. pneumoniae* using micro-IF or ELISA (Medac). The positive sera is tested on
- 25 a ELISA plate coated with the recombinant antigens representing the secreted proteins
- 4) For detection of antibody binding anti-human IgG, IgA or IgM is used. As positive control sera from infected mice are used.
- 30 5) The results from micro-IF or ELISA (Medac) are compared to the ELISA based on recombinant proteins representing the secreted proteins.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

86

**References**

1. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, Huttunen JK, Valtonen V, Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988 Oct 29;2(8618):983-6
2. Shor A, Kuo CC, Patton DL(1992)Detection of Chlamydia pneumoniae in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. *S Afr Med J*.82(3):158-61
3. Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Rev* 62, 379-433
4. Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E.V., Davis, R.W.(1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis. *Science* 282, 754-759
5. Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C., Fan, J., Hyman, R.W., Olinger, L., Grimwood, J., Davis, R.W., Stephens, R.S (1999). Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis. *Nat. Genet.* 21, 385-389
6. Rock, K.L., Alfred L. Goldberg (1999)Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides, *Annu. Rev. Immunol*, 17, 739-779
7. Murdin AD, Su H, Manning DS, Klein MH, Parnell MJ, Caldwell HD(1993)A poliovirus hybrid expressing a neutralization epitope from the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis is highly immunogenic. *Infect Immun* ,61(10):4406-14
8. Cerrone MC, Ma JJ, Stephens RS(1991)Cloning and sequence of the gene for heat shock protein 60 from Chlamydia trachomatis and immunological reactivity of the protein. *Infect Immun* ,59(1):79-90
9. Igietseme JU, Magee DM, Williams DM, Rank RG(1994)Role for CD8+ T cells in antichlamydial immunity defined by Chlamydia-specific T-lymphocyte clones. *Infect Immun* 62(11):5195-7

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

87

10. Subtil A, Blocker A, Dautry-Varsat A (2000) Type III secretion system in Chlamydia species: identified members and candidates. *Microbes Infect* 2(4):367-9
11. Fields KA, Hackstadt T (2000) Evidence for the secretion of *Chlamydia trachomatis* CopN by a type III secretion mechanism *Mol Microbiol* 2000 Dec;38(5):1048-60
12. Read, T.D., Brunham, R.C., Shen, C., Gill, S.R., Heidelberg, J.F., White, O., Hickey, E.K., Peterson, J., Utterback, T., Berry, K., Bass, S., Linher, K., Weidman, J., Khouri, H., Craven, B., Bowman, C., Dodson, R., Gwinn, M., Nelson, W., DeBoy, R., Kolonay, J., McClarty, G., Salzberg, S.L., Eisen, J., Fraser, C.M. (2000) Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res* 28, 1397-1406
13. Shirai M, Hirakawa H, Kimoto M, Tabuchi M, Kishi F, Ouchi K, Shiba T, Ishii, K, Hattori M, Kuhara S, Nakazawa T (2000) Comparison of whole genome sequences of *Chlamydia pneumoniae* J138 from Japan and CWL029 from USA. *Nucleic Acids Res* 15:2311-2314
14. Stambach, M.N., Bevan, M.J.(1994), Cells infected with *Yersinia* present an epitope to class I MHC-restricted CTL., *J Immunol*, 153, 1603-12
15. Rockey, D.D, Heinzen, R.A, and Hackstadt, T. (1995) Cloning and characterisation of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. *Mol. Microbiol* 15, 617-626
16. Bannantine, J., Stamm, W., Suchland, R., Rockey, D.(1998), *Chlamydia trachomatis* IncA is localized to the inclusion membrane and is recognized by antisera from infected humans and primates, *Inct. immun*, 66 , 6017-6021
17. Knudsen K, Madsen AS, Mygind P, Christiansen G, Birkelund S(1999) Identification of two novel genes encoding 97- to 99-kilodalton outer membrane proteins of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun* 67(1):375-83

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

88

18. Shaw, A.C., Christiansen, G., Birkelund, S. (1999) Effects of interferon gamma on Chlamydia trachomatis serovar A and L2 protein expression investigated by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 20(4-5):775-80.
- 5 19. Shaw, A.C., Christiansen, G., Roepstorff, P., Birkelun, S. (2000) Genetic differences in the Chlamydia trachomatis tryptophan synthase a-subunit can explain variations in serovar pathogenesis. *Microbes Infect* 2: 581-592
20. Goborn J, Nordhoff E, Mirgorodskaya E, Ekman R, Roepstorff  
10 P(1999)Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 34(2):105-16
21. Gevaert, K., Demol, H., Puype, M., Broekaert, D., De Boeck, S.,  
15 Houthaève, T., Vandekerckhove, J. (1997) Peptides adsorbed on reverse-phase chromatographic beads as targets for femtomolesequencing by post-source decay matrix assisted laser desorption ionization-reflectron time of flight mass spectrometry (MALDI-RETOF-MS). *Electrophoresis* 18: 2950-2960
- 20 22. Schachter, J., Wyrick, P.B (1994) Culture and isolation of Chlamydia trachomatis. *Methods Enzymol* 236: 377-390
23. Harder, A., Wildgruber, R., Nawrocki, A., Fey, S.J., Larsen, P.M., Gorg, A. (1999) Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 20: 826-829
- 25 24. Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, S, Boucherie H, Mann M (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U SA*: 93: 14440-14445
- 30 25. Mann, M, Wilm, M (1995) Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends Biochem Sci.*,20:219-24

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

89

26. Wilm M, Mann M(1996)Analytical properties of the nanoelectrospray ion source *Anal Chem* 68(1):1-8
27. Wilkins MR, Gasteiger E, Sanchez JC, Appel RD, Hochstrasser DF. Protein identification with sequence tags. *Curr Biol*. 1996 Dec 5 1;6(12):1543-4.
28. Mann M, Hojrup P, Roepstorff P. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol Mass Spectrom*. 1993 Jun;22(6):338-45.
29. Rockey, D.D., Grosenbach, D., Hruby, D.E., Peacock, M.G., Heinzen, R.A., Hackstadt, T.(1997) *Chlamydia psittaci* IncA is phosphorylated by the host cell and is exposed on the cytoplasmic face of the developing inclusion, *Mol. Microbiol.*, 24, 217-228
30. Forster C, Marienfeld S, Wilhelm R, Kramer R(1998)Organelle purification and selective permeabilisation of the plasma membrane:two different 15 approaches to study vacuoles of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*.,*EMS Microbiol Lett* 1998 Oct 15;167(2):209-14
31. Melan MA(1999) Overview of cell fixatives and cell membrane permeants. *Methods Mol Biol* 1999;115:45-55
32. Silber, K.R., Keiler, K.C., Sauer, R.T.(1992) Tsp: a tail-specific protease 20 that selectively degrades proteins with nonpolar C termini.*Proc Natl Acad Sci U S A* ,89, 295-9
33. Hobbs, M, Mattick, J.S.(1993) Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Mol. Microbiol.* 10, 233-243
- 25 34. Cascon, A., Yugueros, J., Temprano, A., Sanchez, M., Hernanz, C., Luengo, J.M., Naharro, G.(2000) A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* ,68,3233-41
35. Stephens, R.S., Kalman, S., Fenner, C., Davis, R.,(1998b) The 30 *Chlamydia* Genome Project, <http://socrates.berkeley.edu:4231/>.
36. Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein,L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A.L.(1994) Inhibitors of the proteasome Block the

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

90

- degradation of Most Cell Proteins and the Generation of Peptides Presented on MHC Class I Molecules. *Cell*, 78, 761,771
37. Filing, S.P., Sutherland, R.A., Steele, L.N., Hess, B., D'Orizio, S.E.F, Maisonneuve, J.-L., Lampe, M., Probst, P., Sternbach, M.N. (2001) CD8 T cells recognize an inclusion membrane associated protein from the vacuolar pathogen *Chlamydia trachomatis*. *PNAS*, 98, 1160-1165
- 5
38. Sijts, A. J., S. Standera, R. E. Toes, T. Ruppert, N. J. Beekman, P. A. van Veelen, F. A. Ossendorp, C. J. Melief, and P. M. Kloetzel (2000). MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells. *J. Immunol.*, 164, 4500
- 10
39. Van Hall, T., A. Sijts, M. Camps, R. Offringa, C. Melief, P. M. Kloetzel, and F. Ossendorp (2000) Differential Influence on Cytotoxic T Lymphocyte Epitope Presentation by Controlled Expression of Either Proteasome Immunosubunits or PA28. *J. Exp.*
- 15
40. Shockett, P., M. Difilippantonio, N. Hellman, and D. G. Schatz (1995). A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 6522
- 20
41. Probst, P., Bhatia, A., Skeiky, Y., Jen, S. (1999), International publication number: WO 00/34483, PCT/US99/290120
42. Hickling K. H. (1998), Measuring human T-lymphocyte function, *Expert Reviews in Molecular Medicine* ISSN 1462-3994
43. Sijts, A.J., Villanueva, M.S., Pamer, E.G: CTL epitope generation is tightly linked to cellular proteolysis of a *Listeria monocytogenes* antigen, *The Journal of Immunology*, 1996, 156, 1497-1503
- 25
44. Hess, J., Kaufmann, S.H: Vaccination strategies against intracellular microbes, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1993, 7, 95-104

30

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

91

## CLAIMS

1. A method for identifying proteins secreted from an intracellular bacteria, comprising the following steps:
- 5           1) infecting host cells by the intracellular bacteria,  
          2) labelling the intracellular bacteria present in the infected cells,  
          3) preparing
- a) whole cell lysates of the infected cells  
                  b) purified and lysed bacteria from the
- 10                                   infected cells,
- 4) comparing 2D-gel electrophoresis protein profiles of i) the whole cell lysates from step 3a) with ii) the purified and lysed bacteria from step 3b),
- 5) detecting protein spots from step 4) which are present in the
- 15                                   whole cell lysates but absent or present in significantly reduced amount in the purified bacteria,
- 6) identifying the proteins in the spots selected in step 5).
2. A method for identifying proteins secreted from an intracellular
- 20           bacteria, comprising the following steps:
- 1) infecting host cells by the intracellular bacteria,  
          2) pulse labelling of the intracellular bacteria present in the infected cells,
- 3) preparing whole cell lysates of the infected cells after different
- 25                                   periods of chase following step 2),
- 4) comparing 2D-gel electrophoresis protein profiles of the whole cell lysates prepared after different periods of chase from step 3),
- 5) detecting protein spots from step 4) which are present in
- 30                                   decreasing amount as chasing periods increase in step 3),
- 6) identifying the proteins in the spots selected in step 5).

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

92

3. A method for identifying proteins secreted from an intracellular bacteria, comprising the following steps:
- 1) infecting host cells by the intracellular bacteria,
  - 2) cultivating the host cells in the presence and in the absence of a proteasome inhibitor, respectively,
  - 3) labelling the intracellular bacteria present in the infected cells cultivated in the presence and in the absence of a proteasome inhibitor, respectively,
  - 4) preparing whole cell lysates of the infected cells,
  - 5) comparing 2D-gel electrophoresis protein profiles of the whole cell lysates of the infected cells cultivated in the presence and in the absence of a proteasome inhibitor, respectively,
  - 6) detecting protein spots from step 5) which are present in the whole cell lysates cultivated in the presence of a proteasome inhibitor, but absent or present in significantly reduced amount in the whole cell lysates cultivated in the absence of a proteasome inhibitor,
  - 7) identifying the proteins in the spots selected in step 6).
4. A method according to any of the claims 1-3, further comprising the following steps:
- 1) obtaining antibodies against proteins from said intracellular bacteria identified according to any of the claims 1-3,
  - 2) 2D-PAGE immunoblotting on whole cell lysates of cells infected with said bacteria using antibodies obtained in step 1),
  - 3) detecting protein spots reacting in step 2),
  - 4) identifying the proteins in the spots selected in step 3).

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

93

5. A method for identifying proteins secreted from an intracellular bacteria, comprising combinations of the methods according to claims 1 to 4.
- 5 6. A method according to any of the claims 1-5, wherein said labelling is by radioactive means, such as [<sup>35</sup>S]cysteine, [<sup>35</sup>S]methionine, [<sup>14</sup>C]labelled amino acids or combinations thereof.
7. A method according to any of the claims 1-6 for identifying proteins, 10 which proteins either in their full length or as immunogenic fragments thereof, are suitable for inclusion in immunogenic compositions and/or diagnostic purposes.
8. A method according to any of the claims 1-7, wherein the 15 identification method is based on Edman degradation or any mass spectrometric method, such as MALDI TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry), ESI Q-TOF MS (Electrospray Ionisation Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry), PSD-MALDI MS (Post Source Decay MALDI Mass Spectrometry) or combinations of such methods. 20
9. A method according to any of the claims 1-8, wherein the proteins 25 prior to identification are subjected to cleavage by chemical methods, such as cyanogen bromide treatment or hydroxylamine treatment, or by enzymatic methods with any suitable enzymes, such as trypsin, stymotrypsin, chymotrypsin, or pepsin, or combinations thereof.
10. A method according to any of the claims 1-9, wherein the intracellular 30 bacteria is a facultative intracellular or obligate intracellular bacterium.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

94

11. A method according to claim 10, wherein the bacterium is from the genus *Chlamydia*, such as *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *C. psittaci* or *C. pecorum*, including any specific serovar or strain of these.
- 5 12. A method according to claim 11, wherein the intracellular bacterium is *Chlamydia trachomatis*.
13. A method according to claim 11, wherein the intracellular bacterium is *Chlamydia pneumoniae*.
- 10 14. A method according to any of the claims 1-13, wherein the host cell is an immortalized cell line, such as HeLa, Hep2, McCoy or U937, a primary cell line obtained from mammalian donors or by autopsy, a genetically modified cell line, or an organ cell culture.
- 15 15. A method according to claims 14, wherein the host cells have been genetically modified to over-express or suppress genes which are recognized as being relevant in context of chlamydial vaccine development, such as genes encoding proteasome subunits or other
- 20 genes encoding functionally important proteins involved in MHC class I presentation.
16. A method according to any of the claims 1-15, wherein the host cells are treated with IFN- $\gamma$  prior to or during infection with the intracellular
- 25 bacteria.
17. A method according to any of the claims 2 or 4-16, wherein proteasome inhibitors, such as MG132, MG262, MG115, epoxymycin, PSI and *clasto*-Lactacystin- $\beta$ -lactone, or combinations thereof, are used.
- 30

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

95

18. A protein identifiable by the method of any of the claims 1-17 or an immunogenic fragment thereof.
19. A protein according to claim 18, which is applicable for inclusion in immunogenic compositions and/or diagnostic purposes, or an immunogenic fragment thereof.
20. A protein according to claim 19, which comprises T-cell epitopes being candidates for presentation as MHC-class I or II restricted antigens suitable for inclusion in immunogenic compositions.
21. A protein according to claim 20, which comprises T-cell epitopes being candidates for presentation as MHC-class I restricted antigens suitable for inclusion in immunogenic compositions.
22. A *Chlamydia trachomatis* protein according to any of the claims 18-21, having the pI and Mw characteristics of one of the proteins DT1-DT77 as given in Table I, determined with an average error of +/- 10%, or an immunogenic fragment thereof.
23. A *Chlamydia trachomatis* protein according to any of the claims 18-21, which is identified by the corresponding gene number as CT017 (gene name CT017), CT044 (gene name ssp), CT243 (gene name lpxD), CT263 (gene name CT263), CT265 (gene name accA), CT286 (gene name clpC), CT292 (gene name dut), CT407 (gene name dksA), CT446 (gene name euo), CT460 (gene name SWIB), CT541 (gene name mip), CT610 (gene name CT610), CT650 (gene name recA), CT655 (gene name kdsA), CT668 (gene name CT668), CT691 (gene name CT691), CT734 (gene name CT734), CT783 (gene name CT783), CT858 (gene name CT858), CT875 (gene name CT875), or ORF5 (gene name ORF5), or by the gene name DT8 as given in Table IIIA, or an immunogenic fragment thereof.

24. A *Chlamydia trachomatis* protein according to any of the claims 18-21, having the pI and Mw characteristics of one of the proteins DT1, DT2, DT3, DT5, DT9, DT10, DT11, DT13, DT14, DT17, DT47, DT59, DT60, DT61 or DT62 as given in Table IV, determined with an average error of +/- 10%, or an immunogenic fragment thereof.
25. A *Chlamydia trachomatis* protein according to claim 22, selected from the proteins DT4 (gene name CT858), DT23 (gene name mip), DT47, DT48 (gene name CT858), DT75, DT76 (gene name CT691), and DT77 (gene name CT263), or an immunogenic fragment thereof.
26. A *Chlamydia pneumoniae* protein according to any of the claims 18-21, having the pI and Mw characteristics of one of the proteins CP1-CP91 as given in Table II, determined with an average error of +/- 10%, or an immunogenic fragment thereof.
27. A *Chlamydia pneumoniae* protein according to any of the claims 18-21, which is identified by the corresponding gene number as CPN0152 (gene name CPN0152), CPN0702, CPN0705 (gene name CPN0705), CPN0711 (gene name CPN0711), CPN0796 (gene name CPN0796), CPN0998 (gene name ftsH), CPN0104 (gene name CPN0104), CPN0495 (gene name aspC), CPN0684 (gene name parB), CPN0414 (gene name accA), CPN1016 (gene name CPN1016), CPN1040 (gene name CPN1040), CPN0079 (gene name r110), CPN0534 (gene name dksA), CPN0619 (gene name ndk), CPN0711 (gene name CPN0711), CPN0628 (gene name rs13), CPN0926 (gene name CPN0926), CPN1016 (gene name CPN1016), CPN1063 (gene name lpiS), or CPN0302 (gene name lpxD) as given in Table IIIB, or an immunogenic fragment thereof.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

97

28. A *Chlamydia pneumoniae* protein according to claim 26, selected from the proteins CP34 (gene name CPN1016), CP37 (gene name CPN0998), CP46 (gene name CPN0796), CP47 (gene name CPN0705), CP52 (gene name CPN0152), CP63 (gene name CPN1016), and CP75 (gene name ndk), or an immunogenic fragment thereof.
29. A *Chlamydia trachomatis* polypeptide, characterized in that it is DT8 and comprises the following sequence (SEQ ID NO: 1):
- 10  
MQHTIMLSLENDNDKLASMMDRVVAASSILSASKDSESN  
RQFTISKAPDKEAPCRVSYVAASALSE
- or an immunogenic fragment thereof.
30. A protein having at least 40 % sequence identity, preferably at least 60%, more preferably at least 70 %, even more preferable at least 80%, further more preferable 90%, and most preferably at least 95% sequence identity to the proteins according to any of the claims 18-29, or an immunogenic fragment thereof.
31. A protein or an immunogenic fragment thereof, which comprises at least 7 consecutive amino acids of the proteins according to any of the claims 18-30.
32. A *Chlamydia trachomatis* protein or an immunogenic fragment thereof according to claim 31, which comprises an amino acid sequence, selected from the sequences of SEQ ID NO. 3 - SEQ ID NO. 45.
33. A *Chlamydia pneumoniae* homolog of the *Chlamydia trachomatis* proteins according to claim 32 or an immunogenic fragment thereof.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

98

which comprises an amino acid sequence, selected from the sequences of SEQ ID NO. 122 – SEQ ID NO. 148.

5 34. A *Chlamydia pneumoniae* protein or an immunogenic fragment thereof according to claim 31, which comprises an amino acid sequence, selected from the sequences of SEQ ID NO. 46 - SEQ ID NO. 121.

10 35. A *Chlamydia trachomatis* homolog of the *Chlamydia pneumoniae* proteins according to claim 34 or an immunogenic fragment thereof, which comprises an amino acid sequence, selected from the sequences of SEQ ID NO. 149 – SEQ ID NO. 194.

15 36. A nucleic acid compound, which comprises a sequence that encodes a protein, or an immunogenic fragment thereof, according to any of the claims 18-35.

20 37. A nucleic acid compound, which comprises a sequence that encodes a polypeptide of claim 29.

25 38. A nucleic acid compound according to claim 37, which comprises the following sequence (SEQ ID NO: 2):

```
ATGCAACACACAATTATGCTGTCITTAGAGAACGATAATGATAAGCTTGCTTCTATGATG  
GATCGAGTTGTTGCTGCGTCATCAAGCATTCTTTCTGCTTCCAAAGATTCTGAGTCCAAT  
AGACAGTTTACTATTCTAAAGCTCCGGATAAAGAAGCTCCTTGACAGATATCTTATGTA  
GCTGCAAGTGCACTTTCAGAATAG
```

30 or a fragment or degenerative sequence thereof.

39. A vector comprising a nucleic acid compound according to any of the claims 36-38.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

99

40. A host cell transformed or transfected with a vector according to claim 39.
- 5 41. Use of a protein or an immunogenic fragment thereof according to any of the claims 18-35 for the production of antibodies against said protein or fragment.
- 10 42. A method for producing an antibody against intracellular bacteria, wherein a protein or an immunogenic fragment thereof according to any of the claims 18-35 are administered to a producing animal, and the antibody is purified there from.
43. An antibody obtainable by the method according to claim 42.
- 15 44. A pharmaceutical or diagnostic composition comprising a protein or fragment thereof, according to any of the claims 18-35, an antibody according to claim 43 or a nucleic acid compound according to any of the claims 36-38.
- 20 45. Use of a protein or a fragment thereof according to any of the claims 18-35, an antibody according to claim 43 or a nucleic acid compound according to any of the claims 36-38 in the preparation of a diagnostic reagent.
- 25 46. A method for identification of T-cell epitopes on secreted proteins from intracellular bacterias, comprising steps, such as computer prediction, MHC class molecule binding assays and/or ELISPOT assays on a protein or an immunogenic fragment thereof identified in a method according to any of the claims 1-17
- 30

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

100

47. A peptide epitope obtainable by the method according to claim 46,  
which peptide epitope is likely to be surface present
- 5 48. A peptide epitope comprising 4 to 25 consecutive amino acids of a  
protein according to any of the claims 18-31, preferably 6 to 15 amino  
acids, and most preferably 7 to 10 amino acids.
- 10 49. A peptide epitope comprising 7 to 10 consecutive amino acids of a  
*Chlamydia trachomatis* or *Chlamydia p*
50. A peptide epitope comprising 4 to 25 consecutive amino acids of a  
polypeptide comprising the sequence SEQ ID NO:1, preferably 6 to  
15 amino acids, and most preferably 7 to 10 amino acids.
- 15 51. A *Chlamydia trachomatis* peptide epitope according to claims 47,  
which comprises an amino acid sequence, selected from the  
sequences of SEQ ID NO. 3 - SEQ ID NO. 45.
- 20 52. A *Chlamydia pneumoniae* peptide epitope of the *Chlamydia*  
*trachomatis* peptide epitopes of claim 51, which comprises an amino  
acid sequence, selected from the sequences of SEQ ID NO. 122 –  
SEQ ID NO. 148.
- 25 53. A *Chlamydia pneumoniae* peptide epitope according to claims 47,  
which comprises an amino acid sequence selected from the  
sequences of SEQ ID NO. 46 - SEQ ID NO.121.
- 30 54. A *Chlamydia trachomatis* peptide epitope of the *Chlamydia*  
*pneumoniae* peptide epitopes of claim 53, which comprises an amino  
acid sequence, selected from the sequences of SEQ ID NO. 149 –  
SEQ ID NO. 194.

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

101

55. A peptide epitope according to any of the claims 47-54, characterized  
in that it is part of a fusion protein.
56. A peptide epitope according to any of the claims 47-54, characterized  
5 in that it is conjugated to a carrier moiety.
57. A nucleic acid compound, characterized in that it comprises a  
sequence that encodes a peptide epitope according to any of the  
claims 47-56.
- 10 58. A vector comprising a nucleic acid compound according to claim 57.
59. A host cell transformed or transfected with a vector according to  
claim 58.
- 15 60. Use of a peptide epitope of any of the claims 47-56 for the  
preparation of an immunogenic composition.
61. An immunogenic composition comprising a peptide epitope according  
20 to any of the claims 47-56, which immunogenic composition  
optionally contains a pharmaceutically acceptable excipient.
62. Use of a protein according to any of the claims 18-35, an antibody  
according to claim 43, a nucleic acid compound according to any of  
25 claims 36-38 or 57, or a peptide epitope according to any of claims  
47-56 in the preparation of a pharmaceutical composition for treating  
or preventing infection due to an intracellular bacteria.
- 30 63. Use of a protein according to any of the claims 22-35, an antibody  
according to claim 43, a nucleic acid compound according to any of  
claims 36-38 or 57, or a peptide epitope according to any of claims

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

102

47-56 in the preparation of a pharmaceutical composition for treating or preventing infection due to a *Chlamydia*.

- 5 64. Use of a protein according to any of the claims 18-35, an antibody according to claim 43, a nucleic acid compound according to any of claims 36-38 or 57, or a peptide epitope according to any of claims 47-56 in the preparation of a diagnostic reagent for detecting the presence of an intracellular bacteria or antibodies raised against the intracellular bacteria.
- 10 65. Use of a protein according to any of the claims 22-35, an antibody according to claim 43, a nucleic acid compound according to any of claims 36-38 or 57, or a peptide epitope according to any of claims 47-56 in the preparation of a diagnostic reagent for detecting the presence of *Chlamydia* or antibodies raised against *Chlamydia*.
- 15 66. A method of inducing an immune response in a human, which comprises administering to said human an immunological effective amount of a protein according to any of claims 18-35, an antibody according to claim 43, a nucleic acid compound according to any of claims 36-38 or 57, or a peptide epitope according to any of claims 47-56.
- 20 67. A method according to claim 66 for treating or preventing infection of humans or animals by an intracellular bacteria.
- 25 68. A method according to any of the claims 66-67, wherein the intracellular bacteria is from the genus *Chlamydia*.
- 30 69. A method according to claim 68, wherein the intracellular bacteria is *C.trachomatis*.

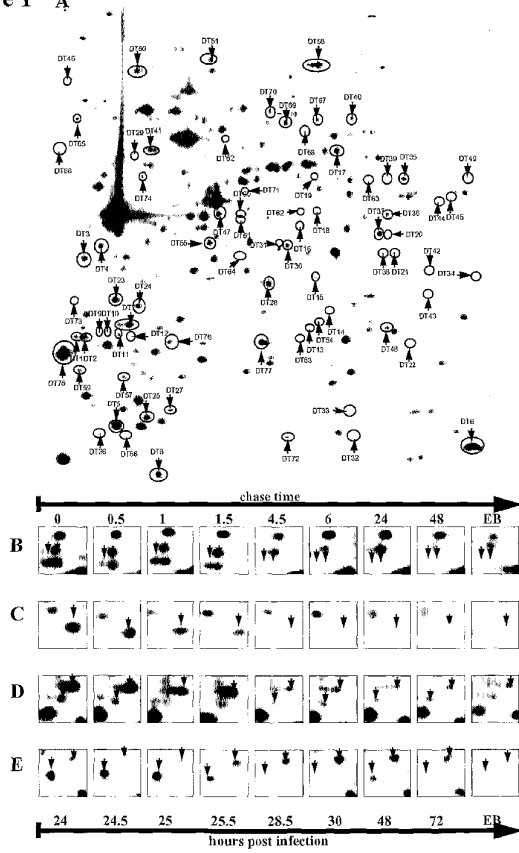
WO 02/082091

PCT/DK02/00234

103

70. A method according to claim 68, wherein the intracellular bacteria is *C. pneumonia*.
- 5 71. A method of producing a protein or a fragment thereof according to any of the claims 18-35, which comprises transforming, transfecting of infecting a host cell with a vector according to claim 39 and culturing the host cell under conditions, which permit the expression of said protein or fragment by the host cell.
- 10 72. A method of producing a peptide epitope of any any of the claims 47-54, which comprises transforming, transfecting of infecting a host cell with a vector according to claim 58 and culturing the host cell under conditions, which permit the expression of said peptide epitope by the host cell.
- 15

Figure 1 A

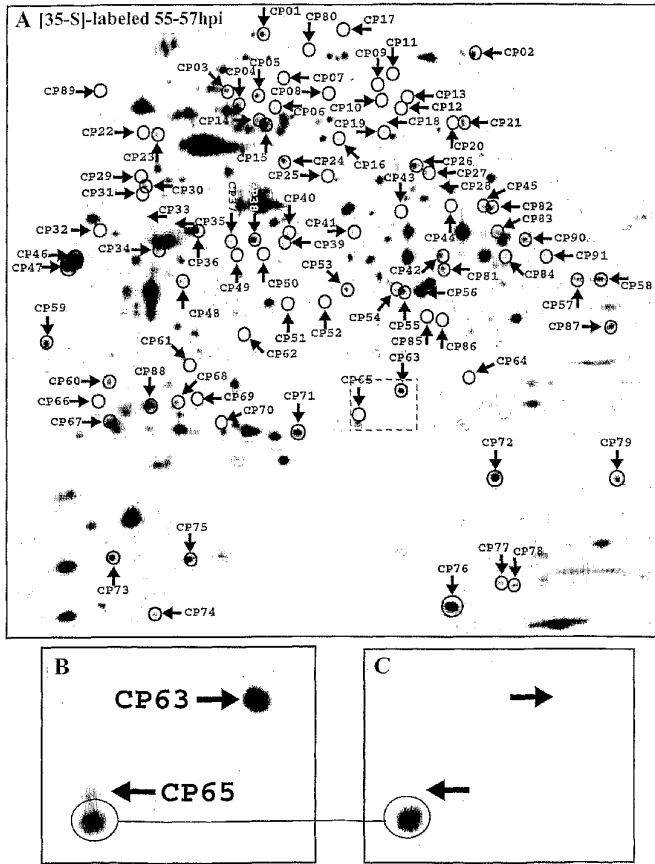


WO 02/082091

PCT/DK02/00234

2/11

Figure 2

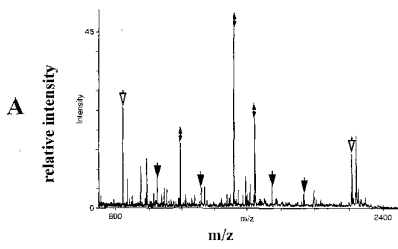


WO 02/082091

PCT/DK02/00234

3/11

Figure 3



**B**

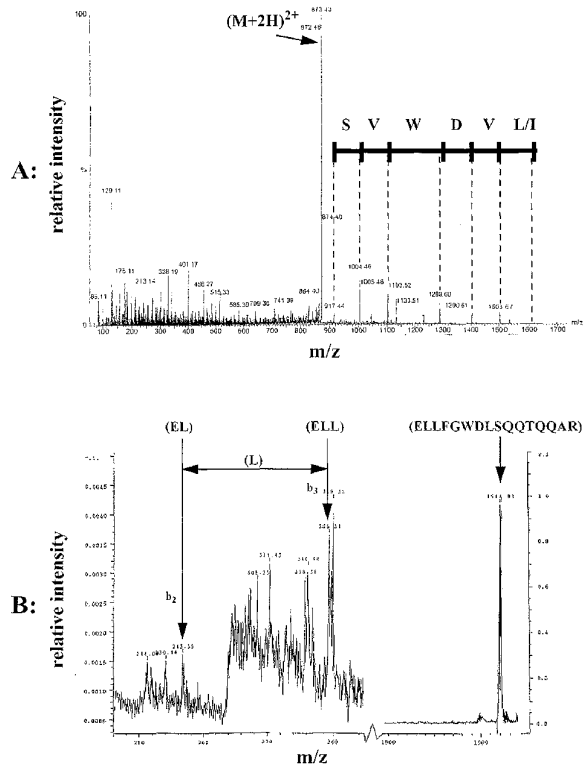
Rank	MS/MS	Score	Protein	Species	Accession #	Protein Name
1	100	98.0	CD45	Human	U09462	CD45
2	100	97.0	CD45	Human	U09462	CD45
3	100	96.0	CD45	Human	U09462	CD45

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

4/11

Figure 4



WO 02/082091

PCT/DK02/00234

5/11

Figure 5

```
ATGCCAACACACAATTATGCTGCTTTAGAGAACGATAATGATAAGCTTGCTTCTATGATG
1 -----+----- 60
M Q H T I M L S L E N D N D K L A S M M

GATCGAGTTGTTGCTGCGTCATGAAGCATTCCTTCTGCTCCAAAGATTCTGAGTCCAAT
61 -----+----- 120
D R V V A A S S S I L S A S K D S E S N

AGACAGTTTACTATTTCTAAAGCTCCGGATAAAGAAGCTCCTTGCAGGTATCTTATGTA
121 -----+----- 180
R Q F T I S K A P D K E A P C R V S Y V

GCTGCAAGTGCACCTTCAGAAATG
181 -----+----- 204
A A S A L S E *
```

Figure 6

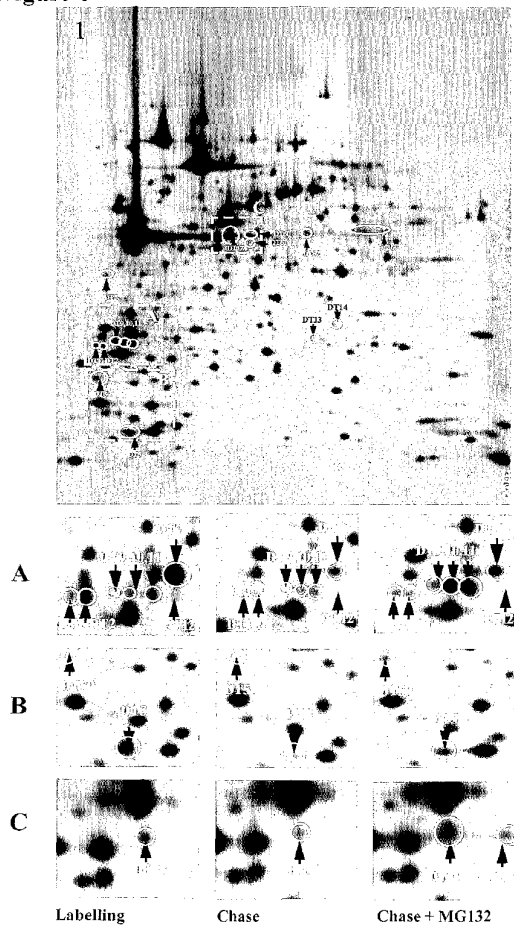


Figure 7



WO 02/082091

PCT/DK02/00234

8/11

Figure 8

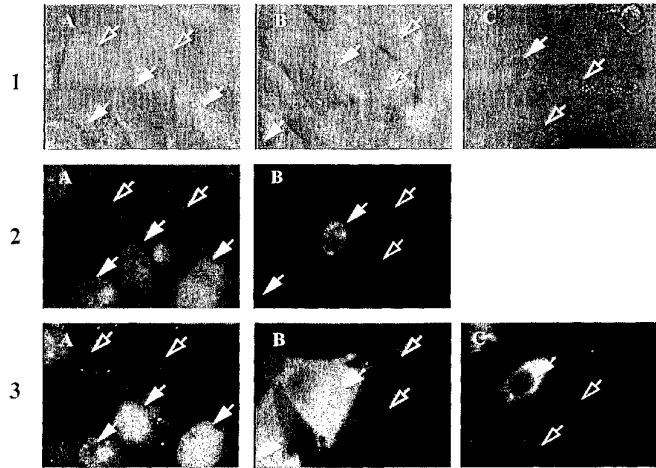
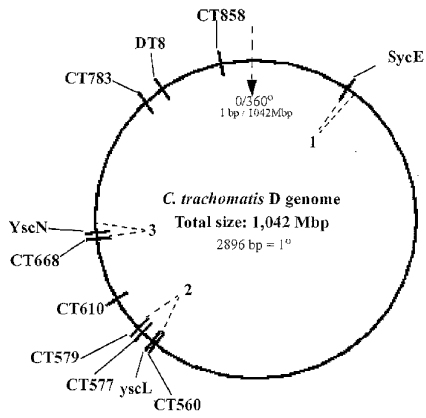


Figure 9

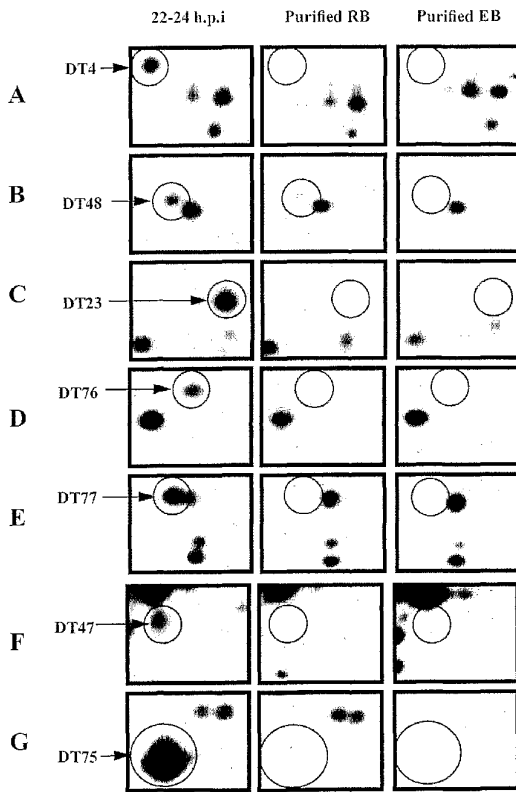


WO 02/082091

PCT/DK02/00234

Figure 10

10/11

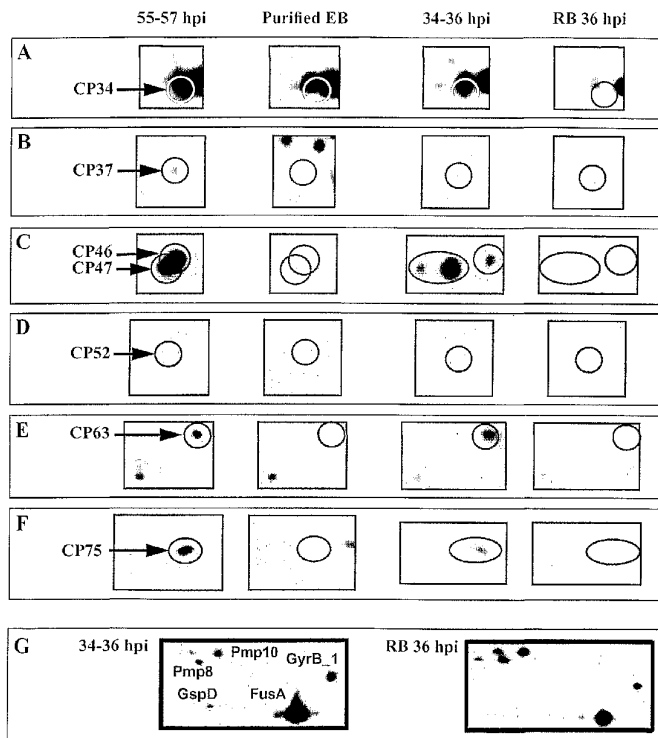


WO 02/082091

PCT/DK02/00234

11/11

Figure 11



WO 02/082091

PCT/DK02/00234

F200100157 WO Sekvensliste Final.ST25.txt  
SEQUENCE LISTING

<110> Vandahl, Brian Berg  
<120> Method for identification of proteins from intracellular bacteria  
<130> P200100157WO  
<150> DK PA 200100581  
<151> 2001-04-09  
<160> 194  
<170> PatentIn version 3.1  
<210> 1  
<211> 67  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis  
<400> 1  
Met Gln His Thr Ile Met Leu Ser Leu Glu Asn Asp Asn Asp Lys Leu  
1 5 10 15  
Ala Ser Met Met Asp Arg Val Val Ala Ala Ser Ser Ser Ile Leu Ser  
20 25 30  
Ala Ser Lys Asp Ser Glu Ser Asn Arg Gln Phe Thr Ile Ser Lys Ala  
35 40 45  
Pro Asp Lys Glu Ala Pro Cys Arg Val Ser Tyr Val Ala Ala Ser Ala  
50 55 60  
Leu Ser Glu  
65  
<210> 2  
<211> 204  
<212> DNA  
<213> Chlamydia trachomatis  
<400> 2  
atgcaacaca caattatgct gtcttagag aacgataatg ataagcttgc ttctatgatg  
60  
gatcagattg ttgctgcgic atcaagcatt ctttctgctt ccaaagattc tgagtccaat  
Side 1

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

F200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

120

agacagttta ctatttctaa agctccggat aaagaagctc cttgcagagt atcttatgta  
180gctgcaagtg cactttcaga atag  
204<210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT263 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 3

Lys Leu Ala Glu Ala Ile Phe Pro Ile  
1 5<210> 4  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT263 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 4

Phe Leu Lys Asn Asn Lys Val Lys Leu  
1 5<210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT263 immunogenic peptide

Side 2

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

E200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;400&gt; 5

Ala Leu Ser Pro Pro Pro Ser Gly Tyr  
1 5

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT263 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 6

Phe Ile Ala Lys Gln Ala Ser Leu Val  
1 5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT263 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 7

Thr Leu Ser Leu Phe Pro Phe Ser Leu  
1 5

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT263 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 8

Side 3

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

Ser Leu Val Ala Cys Pro Cys Ser Met  
1 5

<210> 9  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT263 immunogenic peptide

<400> 9

Leu Ile Phe Ala Asp Pro Ala Glu Ala  
1 5

<210> 10  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT263 immunogenic peptide

<400> 10

Leu Leu Leu Ile Phe Ala Asp Pro Ala  
1 5

<210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT541 immunogenic peptide

<400> 11

Ile Leu Ser Trp Met Leu Met Phe Ala  
Side 4

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

1 P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt  
5

<210> 12  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT541 immunogenic peptide

<400> 12

Lys Gln Met Ala Glu Val Gln Lys Ala  
1 5

<210> 13  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT541 immunogenic peptide

<400> 13

Leu Met Phe Ala Val Ala Leu Pro Ile  
1 5

<210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT541 immunogenic peptide

<400> 14

Lys Leu Gln Tyr Arg Val Val Lys Glu  
1 5

Side 5

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

F200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<210> 15  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT541 immunogenic peptide

<400> 15

Phe Leu Lys Glu Asn Lys Glu Lys Ala  
1 5

<210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT541 immunogenic peptide

<400> 16

Lys Leu Ser Arg Thr Phe Gly His Leu  
1 5

<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT541 immunogenic peptide

<400> 17

Ser Leu Leu Ile Phe Glu Val Lys Leu  
1 5

<210> 18

Side 6

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT541 immunogenic peptide  
  
<400> 18  
Val Leu Ser Gly Lys Pro Thr Ala Leu  
1 5

<210> 19  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT541 immunogenic peptide

<400> 19  
Val Leu Tyr Ile His Pro Asp Leu Ala  
1 5

<210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT541 immunogenic peptide

<400> 20  
Leu Leu Ser Arg Gln Leu Ser Arg Thr  
1 5

<210> 21  
<211> 9  
<212> PRT

Side 7

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT691 immunogenic peptide

<400> 21

Leu Leu Gln Arg Glu Leu Met Lys Val  
1 5

<210> 22  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT691 immunogenic peptide

<400> 22

Ser Thr Ile Asn Val Leu Phe Pro Leu  
1 5

<210> 23  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT691 immunogenic peptide

<400> 23

Pro Leu Gln Ala His Leu Glu Leu Val  
1 5

<210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

Side 8

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT691 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 24

Ser Leu Phe Gly Gln Ser Pro Phe Ala  
1 5

<210> 25  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT691 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 25

Lys Leu Ala Tyr Arg Val Ser Met Thr  
1 5

<210> 26  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT691 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 26

Val Leu Trp Met Gln Ile Ile Lys Gly  
1 5

<210> 27  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING

Side 9

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT691 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 27

Val Leu Phe Pro Leu Phe Ser Ala Leu  
1 5

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT691 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 28

Phe Leu Gln Lys Thr Val Gln Ser Phe  
1 5

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT691 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 29

Phe Gly Gln Ser Pro Phe Ala Pro Leu  
1 5

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT858 immunogenic peptide

Side 10

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;400&gt; 30

Val Leu Ala Asp Phe Ile Gly Gly Leu  
1 5

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT858 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 31

Arg Met Ala Ser Leu Gly His Lys Val  
1 5

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT858 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 32

Gly Leu Asn Asp Phe His Ala Gly Val  
1 5

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT858 immunogenic peptide

Side 11

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;400&gt; 33

Phe Ser Cys Ala Asp Phe Phe Pro Val  
1 5

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT858 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 34

Met Leu Thr Asp Arg Pro Leu Glu Leu  
1 5

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT858 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 35

Ieu Leu Glu Asn Val Asp Thr Asn Val  
1 5

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT858 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 36

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

Arg Met Ile Leu Thr Gln Asp Glu Val  
1 5<210> 37  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT858 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 37

Ser Cys Ala Asp Phe Phe Pro Val Val  
1 5<210> 38  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT858 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 38

Phe Val Phe Asn Val Gln Phe Pro Asn  
1 5<210> 39  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT858 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 39

Tyr Leu Tyr Ala Leu Leu Ser Met Leu  
1 5

Side 13

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<210> 40  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT858 immunogenic peptide

<400> 40

Ser Leu Ala Val Arg Glu His Gly Ala  
1 5

<210> 41  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT858 immunogenic peptide

<400> 41

Tyr Leu Pro Tyr Thr Val Gln Lys Ser  
1 5

<210> 42  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT858 immunogenic peptide

<400> 42

Ala Thr Ile Ala Pro Ser Ile Arg Ala  
1 5

Side 14

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

E200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<210> 43  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT858 immunogenic peptide

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223>

&lt;400&gt; 43

Leu Leu Glu Val Asp Gly Ala Pro Val  
1 5

<210> 44  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT858 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 44

Arg Thr Ala Gly Ala Gly Gly Phe Val  
1 5

<210> 45  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT858 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 45

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

Ser Leu Phe Tyr Ser Pro Met Val Pro  
1 5<210> 46  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0152 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 46

Phe Leu Val Ser Cys Leu Phe Ser Val  
1 5<210> 47  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0152 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 47

Tyr Leu Arg Asp Ala Gln Thr Ile Leu  
1 5<210> 48  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0152 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 48

Leu Leu Ile Arg Ile Gln Asp His Val  
1 5

Side 16

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<210> 49  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0152 immunogenic peptide

<400> 49

Lys Leu Gly Arg Lys Phe Ala Ala Val  
1 5

<210> 50  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0152 immunogenic peptide

<400> 50

Leu Val Ser Arg Thr Gln Gln Thr Leu  
1 5

<210> 51  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0152 immunogenic peptide

<400> 51

Cys Leu Phe Ser Val Ala Ile Gly Ala  
1 5

Side 17

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<210> 52  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0152 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 52

Gly Phe Gly Pro Pro Pro Ile Ile Val  
1 5

<210> 53  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0152 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 53

Ser Leu Pro Thr Lys Pro Tyr Ile Leu  
1 5

<210> 54  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0152 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 54

Arg Ile Gln Asp His Val Thr Ala Asn  
1 5

<210> 55  
<211> 9

Side 18

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0152 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 55

Ala Ile Gly Ala Ser Ala Ala Pro Val  
1 5

<210> 56  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0152 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 56

Arg Leu Gly Ile Ser Gly Phe Ser Leu  
1 5

<210> 57  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0619 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 57

Phe Met Val Ser Gly Pro Val Val Val  
1 5

<210> 58  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

Side 19

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0619 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 58

Leu Val Leu Glu Gly Ala Asn Ala Val  
1 5

<210> 59  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0705 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 59

Phe Val Gly Ala Asn Leu Thr Leu Val  
1 5

<210> 60  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0619 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 60

Cys Leu Ala Glu Asn Ala Phe Ala Gly  
1 5

<210> 61  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

Side 20

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0705 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 61

Lys Ile Glu Glu Val Gln Thr Pro Leu  
1 5

<210> 62  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0705 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 62

Ala Leu Lys Gly His Gln Leu Thr Leu  
1 5

<210> 63  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0705 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 63

Gln Met Ala Glu Ala Ala Asp Leu Val  
1 5

<210> 64  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)

Side 21

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;223&gt; CPN0796 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 64

Phe Met Gly Ala His Val Phe Ala Ser  
1 5

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; FRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0796 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 65

Leu Leu Ile Gln His Ser Ala Lys Val  
1 5

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; FRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0796 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 66

Phe Leu Cys Pro Phe Gln Ala Pro Ser  
1 5

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; FRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0796 immunogenic peptide

Side 22

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;400&gt; 67

Phe Gln Ala Pro Ser Pro Ala Pro Val  
1 5<210> 68  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0796 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 68

Ala Met Asn Ala Cys Val Asn Gly Ile  
1 5<210> 69  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0796 immunogenic peptide<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223>

&lt;400&gt; 69

Phe Met Gly Ile Gln Val Leu His Leu  
1 5<210> 70  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

Side 23

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0796 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 70

Arg His Ala Ala Gln Ala Thr Gly Val  
1 5

<210> 71  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0796 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 71

Phe Gln Tyr Ala Asp Gly Gln Met Val  
1 5

<210> 72  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0796 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 72

Ser Val Ser Ala Met Gly Asn Phe Val  
1 5

<210> 73  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)

Side 24

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;223&gt; CPN0796 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 73

Phe Leu Ser Tyr Arg Ser Gln Val His  
1 5

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0796 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 74

Phe Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ser  
1 5

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0796 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 75

Val Leu Thr Pro Trp Ile Tyr Arg Lys  
1 5

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0796 immunogenic peptide

Side 25

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;400&gt; 76

Ser Val Val Met Asn Gln Gln Pro Leu  
1 5

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0796 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 77

Ser Leu Lys Asn Ser Gln Gln Gln Leu  
1 5

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0796 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 78

Met Leu Pro Asp Thr Leu Asp Ser Val  
1 5

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0796 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 79

Side 26

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

Ala Leu Pro Tyr Thr Glu Gln Gly Leu  
1 5

<210> 80  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0796 immunogenic peptide

<400> 80

Val Leu Ser Gly Phe Gly Gly Gln Val  
1 5

<210> 81  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

<400> 81

Leu Leu Phe Gly Val Val Phe Gly Val  
1 5

<210> 82  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

<400> 82

Ser Leu Gln Glu Arg Tyr Pro Thr Leu  
Side 27

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt  
1 5

<210> 83  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

<400> 83

Met Leu Leu Lys Gly Gln Asn Lys Val  
1 5

<210> 84  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

<400> 84

Phe Thr Phe Leu Pro Ile Ile Leu Val  
1 5

<210> 85  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

<400> 85

Phe Leu Gly Asp Ile Ser Ser Gly Ala  
1 5

Side 28

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<210> 86  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 86

Phe Leu Ala Gly Lys Lys Ala Arg Val  
1 5

<210> 87  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 87

Leu Leu Asp Ala Ala Tyr Gln Arg Ala  
1 5

<210> 88  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 88

Tyr Leu Gly Tyr Leu Phe Thr Phe Leu  
1 5

&lt;210&gt; 89

Side 29

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide  
  
<400> 89  
Tyr Leu Phe Thr Phe Leu Pro Ile Ile  
1 5

<210> 90  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

<400> 90  
Ser Leu Gly Ala Thr His Phe Leu Pro  
1 5

<210> 91  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

<400> 91  
Glu Leu Ile Asp Gln Gly His Arg Leu  
1 5

<210> 92  
<211> 9  
<212> PRT

Side 30

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

E200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<213> Chlamydia pneumoniae  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 92

Phe Leu Pro Ile Ile Leu Val Leu Leu  
1 5

<210> 93  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 93

Leu Val Leu Leu Phe Val Tyr Leu Val  
1 5

<210> 94  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 94

Val Thr Gly Pro Ala Thr Pro Gln Leu  
1 5

<210> 95  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

Side 31

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 95

Ser Leu Glu Lys Gln Asp Pro Glu Val  
1 5

<210> 96  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 96

Ile Leu Met Ala Ala Thr Asn Arg Pro  
1 5

<210> 97  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 97

Leu Thr Gln Glu Thr Asp Thr Glu Ala  
1 5

<210> 98  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING

Side 32

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 98

Met Leu Leu Asp Ala Ala Tyr Gln Arg  
1 5

&lt;210&gt; 99

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 99

Leu Leu Asn Glu Ala Ala Leu Leu Ala  
1 5

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 100

Glu Leu Tyr Asp Gln Leu Ala Val Leu  
1 5

&lt;210&gt; 101

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0998 immunogenic peptide

Side 33

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;400&gt; 101

Leu Ile Gly Lys Tyr Leu Ser Pro Val  
1 5

&lt;210&gt; 102

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 102

Ser Leu Gly Gly Arg Ile Pro Lys Gly  
1 5

&lt;210&gt; 103

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 103

Gly Met Ser Pro Gln Leu Gly Asn Val  
1 5

&lt;210&gt; 104

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0998 immunogenic peptide

Side 34

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;400&gt; 104

Leu Leu Ala Ala Arg Lys Asp Arg Thr  
1 5<210> 105  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 105

Val Thr Phe Ala Asp Val Ala Gly Ile  
1 5<210> 106  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 106

Val Leu Thr Glu Pro Leu Val Val Thr  
1 5<210> 107  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0998 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 107

Side 35

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

Lys Ile Ala Leu Asn Asp Asn Leu Val  
1 5<210> 108  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN1016 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 108

Lys Leu Gly Ala Ile Val Phe Gly Leu  
1 5<210> 109  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN1016 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 109

Tyr Leu Gly Asp Glu Ile Leu Glu Val  
1 5<210> 110  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN1016 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 110

Phe Leu Pro Thr Phe Gly Pro Ile Leu  
1 5

Side 36

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<210> 111  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN1016 immunogenic peptide

<400> 111  
Ser Leu Gln Asn Phe Ser Gln Ser Val  
1 5

<210> 112  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN1016 immunogenic peptide

<400> 112  
Phe Thr Asp Glu Gln Ala Val Ala Val  
1 5

<210> 113  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN1016 immunogenic peptide

<400> 113  
Ser Leu Asn Asp Tyr His Ala Gly Ile  
1 5

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<210> 114  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN1016 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 114

Arg Met Ile Phe Thr Gln Asp Glu Val  
1 5

<210> 115  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN1016 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 115

Thr Gln Gln Ala Arg Leu Gln Leu Val  
1 5

<210> 116  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN1016 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 116

Ser Leu Val Ala Pro Leu Ile Pro Glu  
1 5

<210> 117  
<211> 9

Side 38

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

E200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN1016 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 117

Tyr Met Val Pro Tyr Phe Trp Glu Glu  
1 5

<210> 118  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN1016 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 118

Tyr Val Glu Ala Val Lys Thr Ile Val  
1 5

<210> 119  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN1016 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 119

Phe Thr Gln Asp Glu Val Ser Ser Ala  
1 5

<210> 120  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

Side 39

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN1016 immunogenic peptide

<400> 120

Gly Ala Gly Gly Phe Val Phe Gln Val  
1 5

<210> 121  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN1016 immunogenic peptide

<400> 121

Leu Leu Gly Phe Ala Gln Val Arg Pro  
1 5

<210> 122  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0412 immunogenic peptide

<400> 122

Arg Leu Glu Glu Val Ser Gln Lys Leu  
1 5

<210> 123  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>

Side 40

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

E200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0412 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 123

Leu Thr Thr Asp Thr Pro Pro Val Leu  
1 5

<210> 124  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0412 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 124

Lys Leu Leu Asp Met Glu Gly Tyr Ala  
1 5

<210> 125  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0412 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 125

Val Leu Ser Glu Asp Pro Pro Tyr Ile  
1 5

<210> 126  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)

Side 41

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;223&gt; CPN0412 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 126

Ala Leu Gln Ser Tyr Cys Gln Ala Tyr  
1 5

&lt;210&gt; 127

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0412 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 127

Lys Leu Thr Gln Thr Leu Val Glu Leu  
1 5

&lt;210&gt; 128

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0412 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 128

Phe Val Gly Ala Cys Ser Pro Glu Ile  
1 5

&lt;210&gt; 129

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

<223> CPN0412 immunogenic peptide  
Side 42

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;400&gt; 129

Asn Leu Thr Thr Asp Thr Pro Pro Val  
1 5

&lt;210&gt; 130

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0412 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 130

Leu Met Glu Arg Ala Ile Pro Pro Lys  
1 5

&lt;210&gt; 131

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0661 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 131

Lys Met Ala Glu Val Gln Lys Leu Val  
1 5

&lt;210&gt; 132

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0661 immunogenic peptide

Side 43

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;400&gt; 132

Ala Leu Gly Met Gln Gly Met Lys Glu  
1 5

&lt;210&gt; 133

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0661 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 133

Lys Leu Ser Arg Thr Phe Gly His Leu  
1 5

&lt;210&gt; 134

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0661 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 134

Leu Leu Ile Phe Glu Ile Asn Leu Ile  
1 5

&lt;210&gt; 135

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CPN0661 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 135

Side 44

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

Val Leu Ala Thr Val Ala Leu Ala Leu  
1 5

<210> 136  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0661 immunogenic peptide

<400> 136

Ile Leu Leu Pro Leu Gly Gln Thr Ile  
1 5

<210> 137  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0661 immunogenic peptide

<400> 137

Val Leu Tyr Ile His Pro Asp Leu Ala  
1 5

<210> 138  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> HOMOLOGY  
<222> (1)..(9)  
<223> Homolog to CF541 immunogenic peptide

<400> 138

Leu Val Leu Ala Thr Val Ala Leu Ala  
Side 45

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

1

5

<210> 139  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0681 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 139

Tyr Met Leu Pro Ile Phe Thr Ala Leu  
1 5

<210> 140  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0681 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 140

Leu Leu His Glu Phe Asn Gln Leu Leu  
1 5

<210> 141  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0681 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 141

Val Leu Gln Arg Glu Leu Met Gln Ile  
1 5

Side 46

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<210> 142  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0681 immunogenic peptide

<400> 142

Pro Leu Gln Ala His Leu Glu Met Val  
1 5

<210> 143  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0681 immunogenic peptide

<400> 143

Arg Leu Phe Gly Gln Ser Pro Phe Ala  
1 5

<210> 144  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0681 immunogenic peptide

<400> 144

Gly Leu Phe Met Pro Ile Ser Arg Ala  
1 5

<210> 145

Side 47

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

E200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0681 immunogenic peptide  
  
<400> 145  
Lys Leu Ala His Arg Ile Asn Met Thr  
1 5

<210> 146  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0681 immunogenic peptide

<400> 146  
Tyr Leu Trp Leu Gln Val Ile Arg Arg  
1 5

<210> 147  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia pneumoniae  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CPN0681 immunogenic peptide

<400> 147  
Thr Leu Leu His Glu Phe Asn Gln Leu  
1 5

<210> 148  
<211> 9  
<212> PRT

Side 48

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<213> Chlamydia pneumoniae  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CFN0681 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 148

Phe Gly Gln Ser Pro Phe Ala Pro Leu  
1 5

<210> 149  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT149 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 149

Phe Leu Gly Ala Ala Pro Ala Gln Met  
1 5

<210> 150  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT149 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 150

Phe Leu Gly Ile Gln Asp His Ile Leu  
1 5

<210> 151  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

Side 49

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT149 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 151

Leu Leu Thr Ala Asn Gly Ile Ala Val

1

5

&lt;210&gt; 152

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT149 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 152

Ser Leu Pro Arg Arg Ile Pro Val Leu

1

5

&lt;210&gt; 153

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT149 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 153

Gly Leu Gln Glu His Cys Arg Gly Val

1

5

&lt;210&gt; 154

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

Side 50

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

E200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT149 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 154

Ser Leu Gly Cys His Thr Thr Ile His  
1 5

&lt;210&gt; 155

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT149 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 155

Ile Leu Thr His Phe Gln Ser Asn Leu  
1 5

&lt;210&gt; 156

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT149 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 156

Val Leu Ser Cys Gly Tyr Asn Leu Val  
1 5

&lt;210&gt; 157

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT149 immunogenic peptide

Side 51

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;400&gt; 157

Leu Leu Lys Glu Ile Cys Ala Thr Ile  
1 5

&lt;210&gt; 158

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT149 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 158

Arg Leu Phe Leu Gly Ala Ala Pro Ala  
1 5

&lt;210&gt; 159

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT149 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 159

Ala Thr Val Ala Lys Tyr Pro Glu Val  
1 5

&lt;210&gt; 160

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT149 immunogenic peptide

Side 52

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;400&gt; 160

Leu Leu Ser Gly Ser Gly Phe Ala Ala  
1 5

&lt;210&gt; 161

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT149 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 161

Leu Thr Ala Asn Gly Ile Ala Val Ala  
1 5

&lt;210&gt; 162

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT149 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 162

Ser Gly Phe Ala Ala Pro Val Glu Val  
1 5

&lt;210&gt; 163

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT500 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 163

Side 53

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

Phe Met Ile Ser Gly Pro Val Val Val  
1 5

<210> 164  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT500 immunogenic peptide

<400> 164

Ala Leu Phe Gly Glu Ser Ile Gly Val  
1 5

<210> 165  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT500 immunogenic peptide

<400> 165

Ser Leu Glu Asn Ala Ala Ile Glu Val  
1 5

<210> 166  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT500 immunogenic peptide

<400> 166

Side 54

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

Leu Met Gly Ala Thr Asn Pro Lys Glu  
1 5<210> 167  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT500 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 167

Arg Ile Ala Ala Met Lys Met Val His  
1 5<210> 168  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT671 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 168

Ala Leu Val Glu Thr Pro Met Ala Val  
1 5<210> 169  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT671 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 169

Phe Cys Gly Ala Asn Leu Thr Leu Val  
1 5

Side 55

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<210> 170  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT671 immunogenic peptide

<400> 170

Ser Leu Lys Ala Arg Gln Leu Asn Leu  
1 5

<210> 171  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT671 immunogenic peptide

<400> 171

Gln Leu Thr Glu Ala Thr Gln Leu Val  
1 5

<210> 172  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT671 immunogenic peptide

<400> 172

Asp Leu Gln Trp Val Glu Gln Leu Val  
1 5

Side 56

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<210> 173  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT671 immunogenic peptide  
  
<400> 173  
Ile Val Leu Asp Asn Ser Asn Thr Val  
1 5

<210> 174  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT641 immunogenic peptide

<400> 174  
Leu Leu Phe Gly Val Ile Phe Gly Val  
1 5

<210> 175  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT641 immunogenic peptide

<400> 175  
Leu Leu Ala Lys Gly Gln Asn Lys Val  
1 5

<210> 176  
<211> 9

Side 57

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis  
  
<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT841 immunogenic peptide  
  
<400> 176  
Phe Thr Phe Met Pro Ile Ile Leu Val  
1 5

<210> 177  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT841 immunogenic peptide

<400> 177  
Phe Leu Gly Asp Val Ser Ser Gly Ala  
1 5

<210> 178  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT841 immunogenic peptide

<400> 178  
Leu Leu Asp Ala Ala Tyr Gln Arg Ala  
1 5

<210> 179  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

Side 58

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT841 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 179

Gly Met Ser Asp His Leu Gly Thr Val  
1 5

<210> 180  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT841 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 180

Ser Leu Gly Ala Thr His Phe Leu Pro  
1 5

<210> 181  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT841 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 181

Asn Leu Ala Ala Leu Glu Asn Arg Val  
1 5

<210> 182  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

Side 59

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT841 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 182

Tyr Leu Phe Thr Phe Met Pro Ile Ile

1

5

&lt;210&gt; 183

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT841 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 183

Phe Pro Thr Ala Phe Phe Phe Leu Leu

1

5

&lt;210&gt; 184

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT841 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 184

Ile Leu Met Ala Ala Thr Asn Arg Pro

1

5

&lt;210&gt; 185

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

Side 60

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT841 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 185

Lys Thr Ala Leu Asn Asp Asn Leu Val  
1 5

<210> 186  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT841 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 186

Leu Leu Asn Glu Ala Ala Leu Leu Ala  
1 5

<210> 187  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)  
<223> CT841 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 187

Glu Leu Tyr Asp Gln Leu Ala Val Leu  
1 5

<210> 188  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Chlamydia trachomatis

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)..(9)

Side 61

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;223&gt; CT841 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 188

Ala Leu Glu Lys Gln Asp Pro Glu Val  
1 5

&lt;210&gt; 189

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT841 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 189

Ser Leu Gly Gly Arg Ile Pro Lys Gly  
1 5

&lt;210&gt; 190

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT841 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 190

Phe Met Pro Ile Ile Leu Val Leu Leu  
1 5

&lt;210&gt; 191

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT841 immunogenic peptide

Side 62

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt

&lt;400&gt; 191

Leu Leu Ala Ala Arg Lys Asp Arg Thr  
1 5

&lt;210&gt; 192

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT841 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 192

Val Thr Phe Ala Asp Val Ala Gly Ile  
1 5

&lt;210&gt; 193

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT841 immunogenic peptide

&lt;400&gt; 193

Tyr Thr Ile Ser Pro Arg Thr Asp Val  
1 5

&lt;210&gt; 194

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydia trachomatis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CT841 immunogenic peptide

Side 63

WO 02/082091

PCT/DK02/00234

P200100157 WO Sekvensliste final.ST25.txt  
<400> 194

Leu Ile Gly Ala Pro Gly Thr Gly Lys  
1 5

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization International Bureau



(43) International Publication Date 17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number WO 2002/082091 A3

(51) International Patent Classification: G01N 33/68, C07K 14/295, A61K 39/118

(21) International Application Number: PCT/DK2002/000234

(22) International Filing Date: 9 April 2002 (09.04.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: PA 2001 00581 9 April 2001 (09.04.2001) DK 60/282.513 9 April 2001 (09.04.2001) US

(71) Applicants and (72) Inventors: SHAW, Allan, Christian [DK/DK]; Gronnengen, S. B. [DK]; VANDAHLL, Brian, Berg [DK/DK]; Skovvangsvej 154, st.tv., DK 8200 Aarhus N (DK).

(74) Agent: ZACCO DENMARK A/S; Hans Bekkevold's Allé 7, DK-2900 Hellerup (DK).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

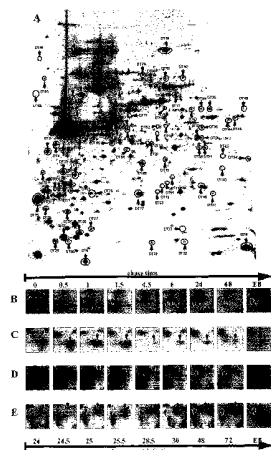
Published: with international search report

(88) Date of publication of the international search report: 4 March 2004

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFICATION OF PROTEINS FROM INTRACELLULAR BACTERIA

WO 2002/082091 A3



(57) Abstract: The present invention relates to a novel combination of methods that enables identification of proteins secreted from intracellular bacteria regardless of the secretion pathway. The invention further provides proteins that are identified by these methods. Secreted proteins are known to be suitable candidates for inclusion in immunogenic compositions and/or diagnostic purposes. The invention also provides peptide epitopes (T-cell epitopes) from the identified secreted proteins, as well as nucleic acid compounds that encode the proteins. The invention further comprises various applications of the proteins or fragments thereof, such as pharmaceutical and diagnostic applications.

**WO 2002/082091 A3**



---

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

## 【手続補正書】

【提出日】平成15年6月25日(2003.6.25)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

クラミジア種の細胞内細菌から分泌されるタンパク質を同定するための方法であって、

- 1) 細胞内細菌によって宿主細胞を感染させるステップと、
  - 2) 感染細胞中に存在する細胞内細菌を標識するステップと、
  - 3) a) 感染細胞の全細胞溶解物、及び  
b) 感染細胞から得られる精製・溶解細菌を調製するステップと、
  - 4) i) ステップ3 a) で得た全細胞溶解物と、ii) ステップ3 b) で得た精製・溶解細菌との、二次元ゲル電気泳動によるタンパク質プロファイルと比較するステップと、
  - 5) 全細胞溶解物中に存在するが、該精製細菌中には存在しないか、若しくは有意に低下した量で存在する、ステップ4) で得たタンパク質スポットを検出するステップと、
  - 6) ステップ5) で選択したスポット中のタンパク質を同定するステップ
- とを含む、上記方法。

## 【請求項2】

クラミジア種の細胞内細菌から分泌されるタンパク質を同定するための方法であって、

- 1) 細胞内細菌によって宿主細胞を感染させるステップと、
  - 2) 感染細胞中に存在する細胞内細菌をパルス標識するステップと、
  - 3) ステップ2) 後の異なる追跡時間後に、感染細胞の全細胞溶解物を調製するステップと、
  - 4) ステップ3) で得た異なる追跡時間後に調製した全細胞溶解物の、二次元ゲル電気泳動によるタンパク質プロファイルと比較するステップと、
  - 5) ステップ3) で追跡時間が増大するにつれ存在量が減少する、ステップ4) で得たタンパク質スポットを検出するステップと、
  - 6) ステップ5) で選択したスポット中のタンパク質を同定するステップ
- とを含む方法。

## 【請求項3】

ステップ1) で感染させた宿主細胞を、それぞれプロテアソーム阻害剤の存在下で培養するステップと、

ステップ4) において、それぞれプロテアソーム阻害剤の存在下及び不在下で培養した感染細胞の、全細胞溶解物の二次元ゲル電気泳動によるタンパク質プロファイルと比較するステップと、

ステップ5) において、プロテアソーム阻害剤の存在下で培養した全細胞溶解物中には存在するが、プロテアソーム阻害剤の不在下で培養した全細胞溶解物中には存在しないか、若しくは有意に低下した量で存在する、ステップ4) で得たタンパク質スポットを検出するステップと、

ステップ6) において、ステップ5) で選択したスポット中のタンパク質を同定するステップ

とを更に含む、請求項2に記載の方法。

## 【請求項4】

- 1) 請求項1から請求項3までのいずれかに従って同定した前記細胞内細菌からのタンパク質に対する抗体を得るステップと、
- 2) ステップ1) で得た抗体を使用して、前記細菌を感染させた細胞の全細胞溶解物に二

次元PAGE免疫プロット法を適用するステップと、

3) ステップ2)において反応するタンパク質スポットを検出するステップと、

4) ステップ3)で選択したスポット中のタンパク質を同定するステップと

をさらに含む、請求項1から請求項3までのいずれかに記載の方法。

【請求項5】

請求項1から請求項4までに記載の方法の組合せを含む、細胞内細菌から分泌されるタンパク質を同定するための方法。

【請求項6】

前記標識が、[35S]システイン、[35S]メチオニン、[14C]標識アミノ酸、又はこれらの組合せからなる放射性手段によるものである、請求項1から請求項5までのいずれかに記載の方法。

【請求項7】

タンパク質を同定するための請求項1から請求項6までのいずれかに記載の方法であって、前記タンパク質が、その完全長で、又はその免疫原性断片として、免疫原性組成物中に含まれること及び/又は診断目的に適している方法。

【請求項8】

同定法が、エドマン分解法、又はMALDI TOF MS(マトリックス支援レーザー脱離/イオン化法飛行時間質量分析法)、ESI Q-TOF MS(エレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間質量分析法)、PSD-MALDI MS(ポストソース分解MALDI質量分析法)などの質量分析法、又はこのような方法の組合せに基づくものである、請求項1から請求項7までのいずれかに記載の方法。

【請求項9】

同定する前にタンパク質を、臭化シアン処理又はヒドロキシルアミン処理などの化学的方法、或いはトリプシン、スリモトリプシン、キモトリプシン、若しくはペプシン又はこれらの組合せなどの適切な酵素を用いる酵素的方法によって切断する、請求項1から請求項8までのいずれかに記載の方法。

【請求項10】

細胞内細菌が、通性細胞内細菌又は偏性細胞内細菌である、請求項1から請求項9までのいずれかに記載の方法。

【請求項11】

細菌が、特定の亜型又は菌株を含む、*C. pneumoniae*、*C. trachomatis*、*C. psittaci*又は*C. pecorum*といったクラミジア属からの細菌である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

細胞内細菌が、*Chlamydia trachomatis*である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

細胞内細菌が、*Chlamydia pneumoniae*である、請求項11に記載の方法。

【請求項14】

宿主細胞が、HeLa、Hep2、McCoy又はU937などの不死化細胞系、哺乳動物ドナーから得たかあるいは剖検によって得た初代細胞系、遺伝的に改変された細胞系、又は器官細胞の培養物である、請求項1から請求項13までのいずれかに記載の方法。

【請求項15】

宿主細胞が、プロテアソームのサブユニットをコードする遺伝子、又はMHCクラスIの提示に関与する機能的に重要なタンパク質をコードする他の遺伝子などの、クラミジアワクチンの開発に適していると認められる遺伝子を過剰に発現するか、又は抑制するように、遺伝的に改変された、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

宿主細胞を、細胞内細菌による感染の前又は最中にIFN- で処理する、請求項1から

請求項 15 までのいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

MG132、MG262、MG115、エポキシマイシン、PSI及びクラスト-ラクタシスチン-ラクトンなどのプロテアソーム阻害剤、又はこれらの組合せを使用する、請求項 2 又は請求項 4 から請求項 16 までのいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

請求項 1 から請求項 17 までのいずれかに記載の方法によって同定可能なタンパク質、又はその免疫原性断片。

【請求項 19】

免疫原性組成物中に含めること、及び/又は診断目的に適用可能である、請求項 18 に記載のタンパク質、又はその免疫原性断片。

【請求項 20】

免疫原性組成物中に含めることに適した、MHCクラス I 又は II 拘束性抗原として提示するための候補である T 細胞エピトープを含む、請求項 19 に記載のタンパク質。

【請求項 21】

免疫原性組成物中に含めることに適した、MHCクラス I 制限抗原として提示するための候補である T 細胞エピトープを含む、請求項 20 に記載のタンパク質。

【請求項 22】

+/-10%の平均誤差で決定される、表 I に示したタンパク質 DT1~DT77 の 1 つの等電点 (pI) 及び分子量 (Mw) 特性を有する、請求項 18 から請求項 21 までのいずれかに記載の *Chlamydia trachomatis* のタンパク質、又はその免疫原性断片。

【請求項 23】

表 III A に示した、CT017 (遺伝子名 CT017)、CT044 (遺伝子名 ssp)、CT243 (遺伝子名 lpxD)、CT263 (遺伝子名 CT263)、CT265 (遺伝子名 accA)、CT286 (遺伝子名 clpC)、CT292 (遺伝子名 dut)、CT407 (遺伝子名 dksA)、CT446 (遺伝子名 euo)、CT460 (遺伝子名 SWIB)、CT541 (遺伝子名 mip)、CT610 (遺伝子名 CT610)、CT650 (遺伝子名 recA)、CT655 (遺伝子名 kdsA)、CT668 (遺伝子名 CT668)、CT691 (遺伝子名 CT691)、CT734 (遺伝子名 CT734)、CT783 (遺伝子名 CT783)、CT858 (遺伝子名 CT858)、CT875 (遺伝子名 CT875)、又は ORF5 (遺伝子名 ORF5) と対応する遺伝子番号によって、あるいは遺伝子名 DT8 によって同定される、請求項 18 から請求項 21 までのいずれかに記載の *Chlamydia trachomatis* のタンパク質、又はその免疫原性断片。

【請求項 24】

+/-10%の平均誤差で決定される、表 IV に示したタンパク質 DT1、DT2、DT3、DT5、DT9、DT10、DT11、DT13、DT14、DT17、DT47、DT59、DT60、DT61 又は DT62 の 1 つの等電点 (pI) 及び分子量 (Mw) 特性を有する、請求項 18 から請求項 21 までのいずれかに記載の *Chlamydia trachomatis* のタンパク質、又はその免疫原性断片。

【請求項 25】

タンパク質 DT4 (遺伝子名 CT858)、DT23 (遺伝子名 mip)、DT47、DT48 (遺伝子名 CT858)、DT75、DT76 (遺伝子名 CT691)、及び DT77 (遺伝子名 CT263) から選択される、請求項 22 に記載の *Chlamydia trachomatis* のタンパク質、又はその免疫原性断片。

【請求項 26】

+/-10%の平均誤差で決定される、表 II に示したタンパク質 CP1~CP91 の 1 つの等電点 (pI) 及び分子量 (Mw) 特性を有する、請求項 18 から請求項 21 までのいずれかに記載の *Chlamydia pneumoniae* のタンパク質、又はその免

疫原性断片。

【請求項27】

表I I I Bに示した、CPN0152(遺伝子名CPN0152)、CPN0702、CPN0705(遺伝子名CPN0705)、CPN0711(遺伝子名CPN0711)、CPN0796(遺伝子名CPN0796)、CPN0998(遺伝子名ftsH)、CPN0104(遺伝子名CPN0104)、CPN0495(遺伝子名aspC)、CPN0684(遺伝子名parB)、CPN0414(遺伝子名accA)、CPN1016(遺伝子名CPN1016)、CPN1040(遺伝子名CPN1040)、CPN0079(遺伝子名rl10)、CPN0534(遺伝子名dksA)、CPN0619(遺伝子名ndk)、CPN0711(遺伝子名CPN0711)、CPN0628(遺伝子名rs13)、CPN0926(遺伝子名CPN0926)、CPN1016(遺伝子名CPN1016)、CPN1063(遺伝子名tpis)、又はCPN302(遺伝子名lpxD)と対応する遺伝子番号によって同定される、請求項18から請求項21までのいずれかに記載のChlamydia pneumoniaeのタンパク質、又はその免疫原性断片。

【請求項28】

タンパク質CP34(遺伝子名CPN1016)、CP37(遺伝子名CPN0998)、CP46(遺伝子名CPN0796)、CP47(遺伝子名CPN0705)、CP52(遺伝子名CPN0152)、CP63(遺伝子名CPN1016)、及びCP75(遺伝子名ndk)から選択される、請求項26に記載のChlamydia pneumoniaeのタンパク質、又はその免疫原性断片。

【請求項29】

DT8であり、以下の配列(配列番号1)：

MQHTIMLSLENDNDKLASMMDRVVAASSSILSASKDSESN  
RQFTISKAPDKEAPCRVSYVAASALSE

を含むことを特徴とする、Chlamydia trachomatisのポリペプチド、又はその免疫原性断片。

【請求項30】

請求項18から請求項29までのいずれかに記載のタンパク質と、少なくとも40%の配列同一性、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、さらに好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するタンパク質、又はその免疫原性断片。

【請求項31】

請求項18から請求項30までのいずれかに記載のタンパク質の少なくとも7個の連続したアミノ酸を含む、タンパク質又はその免疫原性断片。

【請求項32】

配列番号3~配列番号45の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項31に記載のChlamydia trachomatisのタンパク質、又はその免疫原性断片。

【請求項33】

配列番号122~配列番号148の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項32に記載のChlamydia trachomatisタンパク質のChlamydia pneumoniaeの相同体、又はその免疫原性断片。

【請求項34】

配列番号46~配列番号121の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項31に記載のChlamydia pneumoniaeタンパク質、又はその免疫原性断片。

【請求項35】

配列番号149~配列番号194の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項34に記載のChlamydia pneumoniaeタンパク質のChlamydia trachomatis相同体、又はその免疫原性断片。

【請求項36】

請求項 18 から請求項 35 までのいずれかに記載のタンパク質、又はその免疫原性断片をコードする配列を含む核酸化合物。

【請求項 37】

請求項 29 に記載のポリペプチドをコードする配列を含む核酸化合物。

【請求項 38】

以下の配列（配列番号 2）：

```
ATGCAACACACAATTATGCTGTCTTTAGAGAACGATAATGATAAGCTTGCTTCTATGATG
GATCGAGTTGTTGCTGCGTCATCAAGCATTCTTTCTGCTTCCAAAGATTCTGAGTCCAAT
AGACAGTTTACTATTTCTAAAGCTCCGGATAAAGAAGCTCCTTGCAGAGTATCTTATGTA
GCTGCAAGTGCACCTTTCAGAATAG
```

又はその断片あるいは縮重配列を含む、請求項 37 に記載の核酸化合物。

【請求項 39】

請求項 36 から請求項 38 までのいずれかに記載の核酸化合物を含むベクター。

【請求項 40】

請求項 39 に記載のベクターで、形質転換又はトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項 41】

請求項 18 から請求項 35 までのいずれかに記載のタンパク質、又はその免疫原性断片に対する抗体を産生させるための、前記タンパク質又はその断片の使用。

【請求項 42】

細胞内細菌に対する抗体を産生させるための方法であって、請求項 18 から請求項 35 までのいずれかに記載のタンパク質、又はその免疫原性断片を抗体産生動物に投与し、かつ抗体をそこから精製する方法。

【請求項 43】

請求項 42 に記載の方法によって得ることができる抗体。

【請求項 44】

請求項 18 から請求項 35 までのいずれかに記載のタンパク質又はその断片、請求項 43 に記載の抗体、又は請求項 36 から請求項 38 までのいずれかに記載の核酸化合物を含む、医薬医薬組成物又は診断用組成物。

【請求項 45】

診断試薬の調製における、請求項 18 から請求項 35 までのいずれかに記載のタンパク質又はその断片、請求項 43 に記載の抗体、又は請求項 36 から請求項 38 までのいずれかに記載の核酸化合物の使用。

【請求項 46】

クラミジア種の細胞内細菌から分泌されたタンパク質の T 細胞エピトープを同定するための方法であって、請求項 1 から請求項 17 までのいずれかに記載の方法に従って細胞内細菌から分泌されたタンパク質を同定するステップと、次いで、コンピュータによる予測、MHC クラス分子の結合アッセイ及び / 又は ELISPOT アッセイを行なって前記分泌タンパク質又はその免疫原性断片の T 細胞エピトープを同定するステップとを含む方法。

【請求項 47】

表面に存在している可能性があり、請求項 46 に記載の方法によって得ることができる、ペプチドエピトープ。

【請求項 48】

請求項 18 から請求項 31 までのいずれかに記載のタンパク質の 4 ~ 25 個の連続したアミノ酸、好ましくは 6 ~ 15 個のアミノ酸、最も好ましくは 7 ~ 10 個のアミノ酸を含む、ペプチドエピトープ。

【請求項 49】

*Chlamydia trachomatis* 又は *Chlamydia p* の 7 ~ 10 個の連続したアミノ酸を含む、ペプチドエピトープ。

## 【請求項50】

配列番号1の配列を含むポリペプチドの4～25個の連続したアミノ酸、好ましくは6～15個のアミノ酸、最も好ましくは7～10個のアミノ酸を含む、ペプチドエピトープ。

## 【請求項51】

配列番号3～配列番号45の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項47に記載の *Chlamydia trachomatis* のペプチドエピトープ。

## 【請求項52】

配列番号122～配列番号148の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項51に記載の *Chlamydia trachomatis* のペプチドエピトープ中の、*Chlamydia pneumoniae* のペプチドエピトープ。

## 【請求項53】

配列番号46～配列番号121の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項47に記載の *Chlamydia pneumoniae* のペプチドエピトープ。

## 【請求項54】

配列番号149～配列番号194の配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項53に記載の *Chlamydia pneumoniae* のペプチドエピトープ中の、*Chlamydia trachomatis* のペプチドエピトープ。

## 【請求項55】

融合タンパク質の一部であることを特徴とする、請求項47から請求項54までのいずれかに記載のペプチドエピトープ。

## 【請求項56】

担体成分に結合していることを特徴とする、請求項47から請求項54までのいずれかに記載のペプチドエピトープ。

## 【請求項57】

請求項47から請求項56までのいずれかに記載のペプチドエピトープをコードする配列を含むことを特徴とする、核酸化合物。

## 【請求項58】

請求項57に記載の核酸化合物を含むベクター。

## 【請求項59】

請求項58に記載のベクターで、形質転換又はトランスフェクトした宿主細胞。

## 【請求項60】

免疫原性組成物を調製するための、請求項47から請求項56までのいずれかに記載のペプチドエピトープの使用。

## 【請求項61】

任意に、薬剤として許容される賦形剤を含む、請求項47から請求項56までのいずれかに記載のペプチドエピトープを含む免疫原性組成物。

## 【請求項62】

細胞内細菌による感染を治療又は予防するための医薬組成物の調製における、請求項18から請求項35までのいずれかに記載のタンパク質、請求項43に記載の抗体、請求項36から請求項38までのいずれか又は請求項57に記載の核酸化合物、又は請求項47から請求項56までのいずれかに記載のペプチドエピトープの使用。

## 【請求項63】

クラミジアによる感染を治療又は予防するための医薬組成物の調製における、請求項22から請求項35までのいずれかに記載のタンパク質、請求項43に記載の抗体、請求項36から請求項38までのいずれか又は請求項57に記載の核酸化合物、又は請求項47から請求項56までのいずれかに記載のペプチドエピトープの使用。

## 【請求項64】

細胞内細菌又は細胞内細菌に対して産生された抗体の存在を検出するための診断試薬の調製における、請求項18から請求項35までのいずれかに記載のタンパク質、請求項43に記載の抗体、請求項36から請求項38までのいずれか又は請求項57に記載の核酸化

合物、又は請求項 4 7 から請求項 5 6 までのいずれかに記載のペプチドエピトープの使用。

【請求項 6 5】

クラミジア又はクラミジアに対して産生された抗体の存在を検出するための診断試薬の調製における、請求項 2 2 から請求項 3 5 までのいずれかに記載のタンパク質、請求項 4 3 に記載の抗体、請求項 3 6 から請求項 3 8 までのいずれか又は請求項 5 7 に記載の核酸化合物、又は請求項 4 7 から請求項 5 6 までのいずれかに記載のペプチドエピトープの使用。

【請求項 6 6】

ヒトの免疫応答を誘導する方法であって、免疫学的に有効な量の請求項 1 8 から請求項 3 5 までのいずれかに記載のタンパク質、請求項 4 3 に記載の抗体、請求項 3 6 から請求項 3 8 までのいずれか又は請求項 5 7 に記載の核酸化合物、又は請求項 4 7 から請求項 5 6 までのいずれかに記載のペプチドエピトープを前記ヒトに投与することを含む方法。

【請求項 6 7】

細胞内細菌によるヒト又は動物の感染を治療又は予防するための、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

細胞内細菌がクラミジア属からのものである、請求項 6 6 から請求項 6 7 までのいずれかに記載の方法。

【請求項 6 9】

細胞内細菌が *C. trachomatis* である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

細胞内細菌が *C. pneumonia* である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 1】

請求項 1 8 から請求項 3 5 までのいずれかに記載のタンパク質又はその断片を生成する方法であって、請求項 3 9 に記載のベクターを用いて宿主細胞を形質転換、トランスフェクト、又は感染させること、並びに宿主細胞による前記タンパク質又は断片の発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養することを含む方法。

【請求項 7 2】

請求項 4 7 から請求項 5 4 までのいずれかに記載のペプチドエピトープを生成する方法であって、請求項 5 8 に記載のベクターを用いて宿主細胞を形質転換、トランスフェクト、又は感染させること、並びに宿主細胞による前記ペプチドエピトープの発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養することを含む方法。

【請求項 7 3】

ステップ 6 ) で同定される分泌タンパク質又はその免疫原性断片の T 細胞エピトープを同定するために、更に、コンピュータによる予測、MHC クラス分子の結合アッセイ及び / 又は ELISPOT アッセイを行なうステップを含む、請求項 1 から請求項 1 7 までのいずれかに記載の方法。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/DK 02/00234
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/68 C07K14/295 A61K39/118		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, PAJ, WPI Data, EMBL, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HESS J ET AL: "VACCINATION STRATEGIES AGAINST INTRACELLULAR MICROBES" FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 7, no. 2, 1 August 1993 (1993-08-01), pages 95-103, XP002052092 ISSN: 0928-8244 the whole document	1,6-12, 14,16,46
A	WD 99 28475 A (GENSET SA ;GRIFFAIS REMY (FR)) 10 June 1999 (1999-06-10) the whole document page 6, line 25 -page 7, line 11 page 93, line 31 -page 94, line 20 claims 7-23,32-47,55,56	1-12, 14-17
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 January 2003		Date of mailing of the international search report 28 04 2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 346-2040, Tx. 81 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-0316		Authorized officer Tuytman, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/DK 02/00234
C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 27105 A (GENSET SA ;GRIFFAIS REMY (FR)) 3 June 1999 (1999-06-03) the whole document page 87, line 14 -page 88, line 2 claims 7-23,32-47,55,56	1-11, 13-17
Y	--- SHAW ALLAN C ET AL: "Genetic differences in the Chlamydia trachomatis tryptophan synthase alpha-subunit can explain variations in serovar pathogenesis." MICROBES AND INFECTION, vol. 2, no. 6, May 2000 (2000-05), pages 581-592, XP002193164 ISSN: 1286-4579 cited in the application page 582, right-hand column, line 6 -page 583, right-hand column, line 56	1,6-12, 14,16,46
X	SHAW ALLAN CHRISTIAN ET AL: "Effects of interferon gamma on Chlamydia trachomatis serovar A and L2 protein expression investigated by two-dimensional gel electrophoresis." ELECTROPHORESIS, vol. 20, no. 4-5, April 1999 (1999-04), pages 775-780, XP001065244 ISSN: 0173-0835 page 776, left-hand column, line 15 -page 778, left-hand column, line 24; figures 1,3 abstract	2,6,7, 10-12, 14,16
Y	---	46
A	---	1
X	SIJTS ALICE J A M ET AL: "CTL epitope generation is tightly linked to cellular proteolysis of a Listeria monocytogenes antigen." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 156, no. 4, 1996, pages 1497-1503, XP001064234 ISSN: 0022-1767 the whole document abstract page 1498, left-hand column, line 1 -right-hand column, line 31 figures 3,4,7	2-7,10, 14
Y	--- -/--	46

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
 PCT/DK 02/00234

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GEGINAT G ET AL: "A novel approach of direct ex vivo epitope mapping identifies dominant and subdominant CD4 and CD8 T cell epitopes from <i>Listeria monocytogenes</i> ." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 1 FEB 2001, vol. 166, no. 3, 1 February 2001 (2001-02-01), pages 1877-1884, XP002227341 ISSN: 0022-1767 the whole document ---	46
A	WO 99 09006 A (BEHNKE MARK ;ROUSH WILLIAM (US); PLAMONDON LOUIS (US); SOUCY FRANC) 25 February 1999 (1999-02-25) abstract -----	3,15,17

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/DK 02/00234
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 66-70 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 18-72 (in part) because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
see additional sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-17, 46 fully
<b>Remark on Protest</b>		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/DK 02/00234

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 66-70 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 66-70

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 18-72 (in part)

Present claims 18-28,30-36,39-49,51-72 relate to a protein or an immunogenic fragment thereof defined by reference to a desirable characteristic or property, namely being identifiable by a method according to claims 1-17 or 46.

The claims cover all proteins (and corresponding nucleic acids) having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such proteins. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the proteins by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Claims 29,31,37,38,50 relate to a protein or an immunogenic fragment thereof defined in that it is DT 8 and comprises SEQ ID. NO 1 or an immunogenic fragment thereof. Such a definition does not fulfill the requirements of Rule 5.2 PCT.

Consequently, the search will be carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely ONLY those parts relating to the proteins mentioned in Tables I-IV and V-VIII of the description, pages 37-42 and 44-48, for which a COMPLETE AMINO ACID sequence is disclosed according to the provisions of Rule 5.2 PCT and insofar further search fees will be paid. This means that only an immunogenic fragment that CONSISTS OF an amino acid sequence selected from SEQ ID NO 1 and SEQ ID NO 3-SEQ ID NO 194 can form the object of the search insofar further search fees will be paid (See "INVITATION TO PAY

International Application No. PCT/DK 02/00234

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## ADDITIONAL FEES").

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter 11 procedure.

International Application No. PCT/DK 02/00234

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1 : claims 1-17,46 (fully)

Methods for the identification of candidates for a vaccine directed against intracellular bacteria

Inventions 2-90 : 18-23,30,31,36-45,47-49,55-69,71,  
72 (partially) 24,25,32,35,51,54 (fully)

Immunogenic fragments of antigens secreted from Chlamydia Trachomatis consisting of one of the aminoacid sequences of SEQ ID NO. 3-SEQ ID NO. 45 or SEQ ID NO. 149-SEQ ID NO. 194.

Invention 91 : 18-23,30,31,36,39-45,47-49,55-69,71,  
72 (partially); 29,31,37,38,50(fully)

Immunogenic fragment of an antigen secreted from Chlamydia Trachomatis consisting of one of the aminoacid sequences of SEQ ID NO. 1.

Inventions 92-194 : claims : 18-21,30,31,36,39-45,  
47-49,55-68,71,72 (partially) 26,27,28,33,34,52,53,  
70 (fully)

Immunogenic fragments of antigens secreted from Chlamydia Pneumoniae consisting of one of the aminoacid sequences of SEQ ID NO. 46-SEQ ID NO. 148.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat. Application No.

PCT/DK 02/00234

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9928475	A	10-06-1999	AU 754264 B2 07-11-2002
			AU 1254599 A 16-06-1999
			BR 9814912 A 03-10-2000
			CA 2309228 A1 10-06-1999
			CN 1280619 T 17-01-2001
			EP 1032676 A2 06-09-2000
			WO 9928475 A2 10-06-1999
			JP 2002517179 T 18-06-2002
WO 9927105	A	03-06-1999	AU 1170299 A 15-06-1999
			BR 9814878 A 03-10-2000
			CA 2307846 A1 03-06-1999
			CN 1279717 T 10-01-2001
			EP 1032674 A2 06-09-2000
			WO 9927105 A2 03-06-1999
			JP 2002536950 T 05-11-2002
WO 9909006	A	25-02-1999	AU 749857 B2 04-07-2002
			AU 8906296 A 08-03-1999
			BR 9811304 A 13-11-2001
			CA 2301054 A1 25-02-1999
			CN 1271342 T 25-10-2000
			EP 1021407 A1 26-07-2000
			HU 0002724 A2 28-02-2001
			JP 2001515064 T 18-09-2001
			NZ 503169 A 21-12-2001
			WO 9909006 A1 25-02-1999
			US 6133308 A 17-10-2000
			US 6294560 B1 25-09-2001
			US 2002016355 A1 07-02-2002

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 7/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 15/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 27/02	4 C 0 8 6
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 31/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/04	C 0 7 K 14/295	
C 0 7 K 14/295	C 0 7 K 16/12	
C 0 7 K 16/12	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/37	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/37	G 0 1 N 33/569	F
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/68	
G 0 1 N 33/569	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/68	A 6 1 K 37/02	
// G 0 1 N 33/483	G 0 1 N 33/483	F
(C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 R 1:01 )	C 1 2 R 1:01	
(C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 R 1:01 )	C 1 2 R 1:01	
(C 1 2 Q 1/37	C 1 2 Q 1/37	
C 1 2 R 1:01 )	C 1 2 R 1:01	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100102897

弁理士 池田 幸弘

(72) 発明者 ショー、アラン、クリスチャン

デンマーク国、アールフス シー、グロニンゲン 3.3.ティエイチ

(72) 発明者 バンダール、ブライアン、ベルグ

デンマーク国、アールフス エヌ、スコバングスベユ 154、エスティ、ティブイ

Fターム(参考) 2G045 AA25 BB02 BB03 BB20 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 DA77

FB03 FB05 FB08 JA01

4B024 AA01 AA11 BA31 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA04

GA11 HA11

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ13 QQ79 QR16 QR90 QS02 QS16

QX05

4B064 AG01 AG26 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01

DA13 DA15

4B065 AA01X AA01Y AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA44 CA45

CA46

4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA01 BA08 BA17 BA20 BA23 CA04  
NA14 ZA332 ZA542 ZA812 ZB352

4C085 AA03 AA13 AA19 BA45 BB11 BB31 CC22

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZA54 ZA81  
ZB35

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA10 DA75 EA29 EA50 EA52  
FA72 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004534526A5</a>	公开(公告)日	2006-01-05
申请号	JP2002579810	申请日	2002-04-09
[标]申请(专利权)人(译)	显示克里斯·艾伦清 班贝格布赖恩		
申请(专利权)人(译)	展, 艾伦, Kurisuchian 班达尔布赖恩·伯格		
[标]发明人	シヨーアランクリスチアン バンダールブライアンベルグ		
发明人	シヨー、アラン、クリスチアン バンダール、ブライアン、ベルグ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/7088 A61K39/118 A61K39/395 A61K48/00 A61P7/02 A61P15/00 A61P27/02 A61P31/04 C07K14/295 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/37 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/68 C12N5/10 A61K38/00 G01N33/483 C12R1/01		
CPC分类号	A61K39/00 A61K2039/505 A61K2039/53 A61P15/00 A61P27/02 C07K14/295 G01N33/6803 G01N33 /6878 G01N2333/81 G01N2550/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/118 A61K39/395.D A61K48/00 A61P7/02 A61P15/00 A61P27 /02 A61P31/04 C07K14/295 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/37 G01N33/53.D G01N33/569.F G01N33/68 C12N5/00.A A61K37/02 G01N33/483.F C12R1/01		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BB02 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045 /DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB08 2G045/JA01 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024 /DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ79 4B063/QR16 4B063/QR90 4B063/QS02 4B063/QS16 4B063/QX05 4B064 /AG01 4B064/AG26 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B064/DA15 4B065/AA01X 4B065/AA01Y 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA45 4B065 /CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA20 4C084/BA23 4C084/CA04 4C084/NA14 4C084/ZA332 4C084/ZA542 4C084/ZA812 4C084 /ZB352 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA19 4C085/BA45 4C085/BB11 4C085/BB31 4C085/CC22 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086 /ZA33 4C086/ZA54 4C086/ZA81 4C086/ZB35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA10 4H045/DA75 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045 /FA74		
代理人(译)	池田幸		
优先权	200100581 2001-04-09 DK 60/282513 2001-04-09 US		
其他公开文献	JP2004534526A		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种新的组合方法, 能够鉴定从细胞内分泌的蛋白质而不管分泌途径。此外, 本发明提供了通过这些方法鉴定的蛋白质。已知分泌的蛋白质包括在免疫原性组合物中和/或是适用于诊断目的的候选物。本发明还提供了来自鉴定的分泌蛋白的肽表位 (T细胞表位) 和编码这些蛋白的核酸化合物。此外, 本发明包括蛋白质或其片段的各种用途, 例如药物和诊断应用。

