

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 140**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 14/29 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2006 E 06749212 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 1879914**

54 Título: **Antígenos DIVA (de Diferenciación entre Animales Vacunados e Infeccionados) de Erlichia canis**

30 Prioridad:

04.04.2005 US 668205 P

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

04.11.2015

73 Titular/es:

**IDEXX LABORATORIES, INC. (100.0%)
ONE IDEXX DRIVE
WESTBROOK, MAINE 04092, US**

72 Inventor/es:

**KRAH, EUGENE, REGIS, III y
BEALL, MELISSA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 550 140 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Antígenos DIVA (de Diferenciación entre Animales Vacunados e Infeccionados) de *Ehrlichia canis*

La presente invención se refiere a métodos para distinguir entre un animal que ha sido infectado con *Ehrlichia canis* y un animal que no ha sido infectado con *E. canis*, a los métodos para determinar la presencia o la ausencia de un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un polipéptido de *E. canis*, y a composiciones que comprenden un polipéptido de *E. canis*.

La *Ehrlichia* es un patógeno intracelular obligado que infecta los glóbulos blancos circulantes en anfitriones mamíferos. *Ehrlichia canis* puede infectar cánidos y seres humanos y causar ehrlichiosis monocítica canina (EMC) y ehrlichiosis monocítica humana (EMH), respectivamente. La enfermedad canina se caracteriza por fiebre, linfadenopatía, pérdida de peso y pancitopenia. En los seres humanos la enfermedad se caracteriza por fiebre, dolor de cabeza, mialgia, y leucopenia. La detección y el tratamiento tempranos son importantes para el tratamiento de la ehrlichiosis tanto canina como humana.

En una realización, la invención proporciona un método para distinguir entre los animales que han sido infectados con *E. canis* y los animales que no han sido infectados con una vacuna de *E. canis*. El método comprende poner en contacto una muestra biológica de un animal con un polipéptido purificado de *E. canis* que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 10, detectar si un anticuerpo de la muestra se une específicamente al polipéptido purificado de *E. canis*, y determinar que el animal está infectado mediante la correlación de un resultado positivo en la etapa de detección con una infección natural y la determinación de que el animal no está infectado mediante la correlación de un resultado negativo con ausencia de infección. El método puede comprender además detectar si un anticuerpo de la muestra se une específicamente a un segundo polipéptido purificado de *E. canis* que se une específicamente a un anticuerpo que es un componente de la respuesta inmunitaria del animal a la vacuna, determinando de este modo si el animal ha sido vacunado.

Otra realización de la invención proporciona un método para determinar la presencia o ausencia de un anticuerpo o fragmento del mismo, en una muestra de ensayo, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un polipéptido purificado que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 10. El método comprende poner en contacto la muestra de ensayo con un polipéptido purificado que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 10 en condiciones adecuadas para la unión específica del polipéptido purificado al anticuerpo o fragmento del mismo, y detectar la presencia o ausencia de unión específica. La presencia de unión específica indica la presencia del anticuerpo o fragmento del mismo. La ausencia de unión específica indica la ausencia del anticuerpo o fragmento del mismo. El método puede comprender adicionalmente la detección de la cantidad de unión específica. La muestra de ensayo puede ser suero, sangre, o saliva. El polipéptido purificado se puede inmovilizar en un soporte sólido. El polipéptido purificado puede estar marcado. La detección puede ser mediante radioinmunoanálisis, análisis de inmunoadsorción con enzima ligada, inmunohistoquímica, o análisis inmunoenzimático.

Otra realización de la invención proporciona una composición que comprende uno o más polipéptidos purificados que consisten en el SEQ ID NO: 10.

El polipéptido purificado puede estar en una forma multimérica. El polipéptido purificado puede estar ligado a una proteína heteróloga (una secuencia de aminoácidos que normalmente no está asociada con el polipéptido purificado en la naturaleza), un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un conector de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de parada de la transferencia, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas, o una combinación de los mismos.

Por lo tanto, la invención proporciona antígenos de *Ehrlichia canis* que se pueden utilizar para diferenciar los animales infectados naturalmente por *E. canis* de los animales que no han sido infectados por *E. canis*. La invención también proporciona composiciones y métodos para determinar la presencia de anticuerpos contra polipéptidos de *E. canis*.

La Figura 1 muestra la evaluación de SNAP[®]3Dx[®] Assay de perros beagle de laboratorio. El dispositivo de SNAP[®] se utilizó como describe el fabricante. La muestra "Pre" es desde el día 0. La muestra "Post" es desde el día 42. La aplicación positiva para *E. canis* fue positiva en los 4 perros para la muestra del día 42. Se observaron resultados similares para la muestra del día 70.

La Figura 2 muestra un gel de proteínas de *E. canis* separadas mediante electroforesis en gel 2D. Teñido con Azul de Coomassie BIOSAFE[™] (Bio-Rad Inc.).

La Figura 3 muestra una transferencia Western de proteínas de *E. canis* utilizando sueros de perro cosechados el día 0. La dilución del plasma es 1:100. Estos perros fueron negativos para la reactividad con antígenos de *E. canis*.

La Figura 4 muestra una transferencia Western de proteínas de *E. canis* utilizando sueros de perro de una reserva de cuatro animales sensibilizados. La dilución de los sueros es 1:100.

La Figura 5 muestra una transferencia Western de proteínas de *E. canis* utilizando plasma de perro de una reserva de animales infectados. La dilución de los sueros es 1:1.000.

5 La Figura 6 muestra una transferencia Western de seis diferentes antígenos DIVA de *E. canis* expresados en *E. coli* y sondeados con cualquier suero de perro de una reserva de cuatro animales infectados (A) o sueros de perro reunidos de cuatro animales sensibilizados (B). Las diluciones de suero fueron de 1:100 para los animales sensibilizados o de 1:500 para los animales infectados. Los antígenos DIVA representados incluyen: (1) el antígeno de 200 kDa, (2) la proteína ribosomal L1, (3a y 3b) "ATPasa" - dos segmentos diferentes, (4) el antígeno de 120 kDa, (5) Proteínas de choque térmico/antígeno p16.

10 La Figura 7 demuestra que el antígeno p16 clonado es reconocido por sueros de perros infectados con *E. canis* pero no aquellos sensibilizados con el organismo cultivado. Los productos lisados de bacterias no inducidas (U) o inducidas (I) transformadas con un vector que expresaba el antígeno p16 o el fragmento genómico original (+C) se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa para el análisis de transferencia Western.

La Figura 8 muestra la secuencia repetida en el SEQ ID NO: 15.

La Figura 9A muestra el SEQ ID NO: 16.

15 La Figura 9B muestra el SEQ ID NO: 17.

Se describen los antígenos de *Ehrlichia canis* que se pueden utilizar para diferenciar animales infectados naturalmente por *E. canis* de animales que han sido sensibilizados con *E. canis*, *p. ej.*, vacunados contra *E. canis*.

20 Antes de describir la presente invención en detalle, se definirán una serie de términos. Según se utilizan en la presente memoria, las formas singulares "un", "uno", "una" y "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

25 Según se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido" se refiere a un compuesto de una sola cadena o un complejo de dos o más cadenas de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. La cadena o las cadenas pueden tener cualquier longitud y pueden comprender una proteína de fusión. Aunque "proteína" se utiliza a menudo en referencia a polipéptidos relativamente grandes, y "péptido" se utiliza a menudo en referencia a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos en la técnica se solapa y varía. El término "polipéptido" según se utiliza en la presente memoria se refiere de ese modo indistintamente a péptidos, polipéptidos, proteínas o proteínas de fusión a menos que se indique lo contrario. El término "aminoácido" se refiere a una unidad monomérica de un péptido, polipéptido o proteína.

30 Según se utiliza en la presente memoria, "antígeno" se refiere a una molécula contra la que un sujeto puede iniciar una respuesta inmunitaria humoral y/o celular. Los antígenos pueden ser cualquier tipo de molécula biológica, incluyendo, por ejemplo, metabolitos intermedios simples, azúcares, lípidos, y hormonas, así como macromoléculas tales como carbohidratos complejos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas. En las composiciones y métodos de la invención, el antígeno es un polipéptido, *p. ej.*, uno que comprende al menos aproximadamente seis o más aminoácidos.

35 Según se utiliza en la presente memoria, un "derivado" de un polipéptido antigénico de *E. canis*, o un antígeno o polipéptido que "deriva de" un antígeno o polipéptido de *E. canis*, se refiere a un antígeno o polipéptido en el que la forma nativa ha sido purificada, modificada o alterada. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a: sustituciones, modificaciones, adiciones o supresiones de aminoácidos; alteraciones en el patrón de lipidación, glicosilación o fosforilación; reacciones de grupos laterales amino, carboxilo, o hidroxilo libres de los residuos de aminoácidos presentes en el polipéptido con otras moléculas orgánicas y no orgánicas; y otras modificaciones, cualquiera de las cuales pueden dar como resultado cambios en la estructura primaria, secundaria o terciaria.

45 Una "muestra biológica" es cualquier muestra de un animal que se espera que contenga inmunoglobulinas. Generalmente, estas muestras son de sangre completa y de componentes sanguíneos, pero en algunas circunstancias pueden incluir saliva, orina, lágrimas, otros fluidos corporales, extractos de tejidos o extractos celulares.

Una "infección", tal como en una infección por *E. canis*, significa que un animal ha estado expuesto a *E. canis*, independientemente de si el animal presenta síntomas clínicos de *E. canis*. Una infección natural se refiere a una exposición que se produce como resultado de uno de los métodos de transmisión naturales para *E. canis*, tales como la transmisión por garrapatas. Una infección no incluye una exposición a *E. canis* mediante la vacunación.

50 Un "polipéptido o antígeno que no es un elemento de una vacuna de *E. canis*" es cualquier polipéptido o antígeno de *E. canis* que no está presente en, o no es una porción inmunogénicamente activa de una o varias vacunas de *E. canis* concretas. Los elementos de la vacuna o las vacunas pueden ser porciones de una vacuna de subunidades que incluye menos que toda la bacteria; estas porciones se pueden sintetizar químicamente o se pueden expresar de manera recombinante antes de convertirse en parte de la vacuna, y estas porciones pueden estar codificadas por uno o más vectores que expresan una composición inmunogénica *in vivo*.

Un "anticuerpo que es un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a una vacuna de *E. canis*" se refiere a un anticuerpo que se obtiene como resultado de una vacunación con una vacuna de *E. canis*. Estos anticuerpos pueden ser idénticos o similares a los anticuerpos obtenidos como resultado de una infección por *E. canis* natural. Estos anticuerpos se mantendrán a un título suficiente y con el fin de proporcionar un efecto protector y neutralizador contra la bacteria. Una vacunación satisfactoria produce un nivel medible del anticuerpo (o anticuerpos) que es obtenido por un componente de la vacuna de *E. canis*. Los ejemplos de los antígenos de *E. canis* que provocan anticuerpos que pueden ser un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a una vacuna de *E. canis* son p28-1, p28-2, p28-3, p28-4, p28-5, p28-6, p28-7, p28-8, p28-9 (véanse las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6660269; 6.458.942; 6.403.780; 6.392.023), ProA, ProB, mmpA, citocromo oxidasa (véase la Publicación de la Patente de los Estados Unidos 20040170972), p43 (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.355.777), que es la porción N-terminal de p153, una glicoproteína (véase la Publicación de la Patente de los Estados Unidos 2004/0121433), y p153.

Una respuesta inmunitaria consiste en el desarrollo en un organismo de una respuesta inmunitaria mediada por células y/o anticuerpos a un antígeno tal como un polipéptido. Por lo general, dicha respuesta incluye, pero no se limita a uno o más de los siguientes: producción de anticuerpos, células B, células T coadyuvantes, células T supresoras, y/o células T citotóxicas. Una respuesta inmunitaria se puede detectar utilizando cualquiera de los diversos análisis conocidos por los expertos en la técnica.

Polipéptidos de la invención

Las muestras biológicas de los animales que han sido vacunados contra la *E. canis* tienen el potencial de producir un resultado positivo en una prueba para infección por *E. canis* debido a la presencia de anticuerpos producidos en respuesta a la vacuna. En un aspecto, la invención proporciona un método para distinguir entre los animales que han sido infectados con *E. canis* y los animales que no han sido infectados con *E. canis*. Los métodos incluyen poner en contacto una muestra biológica del animal con un antígeno derivado de *E. canis* que no se une específicamente a un anticuerpo que es un componente de la respuesta de anticuerpos del animal a una vacuna de *E. canis* concreta.

El desarrollo de anticuerpos de *E. canis* en un animal frente a una vacuna depende de la vacuna concreta utilizada para vacunar al animal. La diferencia en la respuesta inmunitaria entre los animales que se vacunan contra *E. canis* y los animales que están naturalmente o experimentalmente infectados con *E. canis* proporciona un medio para determinar si un animal ha sido vacunado o si está infectado de forma natural o experimentalmente. Por lo tanto, utilizando los métodos de la invención, los animales que han sido infectados con *E. canis* se pueden distinguir de los animales que no han sido infectados con *E. canis*. Los antígenos de la invención, sus regiones inmunodominantes y epítomos se pueden utilizar en los métodos de la invención. Estas composiciones pueden ser referidas como antígenos DIVA (Diferenciación entre Animales Vacunados e Infectados) de *E. canis*. Un antígeno DIVA de *E. canis* induce una respuesta inmunitaria, p. ej., la producción de anticuerpos específicos, en un animal que es diferente de la respuesta inmunitaria inducida en el animal por una vacuna de *E. canis* concreta.

En consecuencia, la detección de la unión entre un antígeno DIVA de *E. canis* y un anticuerpo que no es un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a una vacuna concreta puede indicar una infección natural. La ausencia de tal unión puede indicar vacunación o ausencia de infección. Además, un segundo antígeno, separado, tal como un antígeno de *E. canis* que se une específicamente a un anticuerpo que es un componente de la respuesta inmunitaria del animal a una vacuna concreta de *E. canis*, se puede utilizar para detectar los anticuerpos producidos en respuesta a la vacunación. La detección de ningún anticuerpo indica que no hay infección ni vacunación. Como tales, varias combinaciones de reactivos de captura separados pueden conducir a una determinación de la vacunación y/o el estado de infección del sujeto de ensayo.

En un aspecto, un método de la invención incluye poner en contacto una muestra biológica de un animal con un antígeno que es una parte de la bacteria *E. canis* nativa, pero no es un elemento de una vacuna de *E. canis* concreta. Un animal es cualquier mamífero que es probable que esté vacunado contra *E. canis* y, en particular, cánidos. Además, los seres humanos pueden ser vacunados contra *E. canis*. En otro aspecto, la invención incluye un método para determinar si un animal no ha sido infectado por *E. canis* y no ha sido vacunado contra *E. canis*. Una muestra biológica de un animal se analiza para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para un antígeno DIVA de *E. canis*, y la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para una vacuna de *E. canis* concreta. Después se determina que el animal no ha sido infectado y no ha sido vacunado mediante la determinación de la ausencia de tales anticuerpos.

En un aspecto de la invención, un antígeno DIVA no es un elemento de una vacuna de *E. canis*. El estado de vacunación o infección de un animal se puede determinar mediante la detección de si los anticuerpos de la muestra se unen a uno o más antígenos utilizados en la vacuna. Si los anticuerpos de la muestra se unen a uno o más de los antígenos, el animal está vacunado o infectado. Si ningún anticuerpo se une al polipéptido DIVA, se puede determinar que el animal ha sido vacunado. Si no se detecta unión a ningún antígeno, se puede determinar que el animal no está infectado y no está vacunado.

Un polipéptido de la invención puede ser modificado después de la traducción. Un polipéptido purificado es una

preparación de polipéptido que está sustancialmente libre de material celular, otros tipos de polipéptidos, precursores químicos, productos químicos utilizados en la síntesis del polipéptido, o combinaciones de los mismos. Una preparación de polipéptido que está sustancialmente libre de material celular, medio de cultivo, precursores químicos, productos químicos utilizados en la síntesis del polipéptido tiene menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5%, 1% o más de otros polipéptidos, medio de cultivo, precursores químicos, y/u otros productos químicos utilizados en la síntesis. Por lo tanto, un polipéptido purificado es aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más puro.

Los polipéptidos purificados de la invención pueden ser polipéptidos completos o fragmentos de polipéptidos. Por ejemplo, los fragmentos de polipéptidos de la invención pueden comprender aproximadamente 6, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 250, 500, 750 aminoácidos contiguos o más de los polipéptidos de la invención. Los polipéptidos de la invención incluyen los que se muestran en el SEQ ID NO: 10. Los polipéptidos variantes son idénticos al menos aproximadamente en 80, o idénticos en aproximadamente 90, 96, 98, o 99% a la secuencia de polipéptidos mostrada en el SEQ ID NO: 10 y también son polipéptidos de la invención. Los polipéptidos variantes tienen una o más variaciones de aminoácidos conservativas u otras modificaciones menores y retienen la actividad biológica, es decir, son equivalentes biológicamente funcionales. Un equivalente biológicamente activo tiene la función sustancialmente equivalente en comparación con el correspondiente polipéptido de tipo salvaje.

El porcentaje de identidad de secuencia tiene un significado reconocido en la técnica y hay numerosos métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polipéptidos o polinucleótidos. Véase, *p. ej.*, Lesk, Ed., Computational Molecular Biology, Oxford University Press, Nueva York, (1988); Smith, Ed, Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Academic Press, Nueva York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Humana Press, Nueva Jersey, (1994); von Heinje, Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press, (1987); y Gribskov & Devereux, Eds., Sequence Analysis Primer, M Stockton Press, Nueva York, (1991). Los métodos para el alineamiento de polinucleótidos o polipéptidos están codificados en programas informáticos, incluyendo el paquete de programas GCG (Devereux et al., Nuc. Acids Res. 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul et al., J. Molec. Biol. 215:403 (1990)), y el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) que utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. App. Math, 2:482-489 (1981)). Por ejemplo, el programa informático ALIGN que emplea el algoritmo FASTA se puede utilizar, con una búsqueda de huecos afines con una penalización de hueco abierto de -12 y una penalización de extensión de hueco de -2.

Cuando se utiliza cualquiera de los programas de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia concreta es, por ejemplo, aproximadamente idéntica en 95% a una secuencia de referencia, los parámetros se ajustan de tal manera que el porcentaje de identidad se calcula a lo largo de la longitud completa del polinucleótido de referencia y que se permiten huecos en la identidad de hasta 5% del número total de nucleótidos en el polinucleótido de referencia.

Las variantes generalmente se pueden identificar modificando una de las secuencias de polipéptidos de la invención, y evaluando las propiedades del polipéptido modificado para determinar si es un equivalente biológico. Una variante es un equivalente biológico si reacciona sustancialmente igual que un polipéptido de la invención en un análisis tal como un análisis inmunohistoquímico, un análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), un radioinmunoanálisis (RIA), un análisis inmunoenzimático o un análisis de transferencia western, *p. ej.*, tiene 90-110% de la actividad del polipéptido original. En una realización, el análisis es un análisis de competición en donde el polipéptido biológicamente equivalente es capaz de reducir la unión del polipéptido de la invención a un antígeno o anticuerpo reactivo correspondiente en aproximadamente 80, 95, 99, o 100%. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de tipo salvaje correspondiente también se une específicamente al polipéptido variante. Los polipéptidos variantes de la invención pueden comprender aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 sustituciones de aminoácidos conservativas.

Una sustitución conservativa es una en la que se sustituye un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de tal manera que un experto en la técnica de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido siguieran sustancialmente inalteradas. En general, los siguientes grupos de aminoácidos representan cambios conservativos: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his.

Un polipéptido de la invención puede comprender adicionalmente una secuencia señal (o líder) que dirige co-traduccionalmente o post-traduccionalmente la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede comprender un conector u otra secuencia para facilitar la síntesis, la purificación o la identificación del polipéptido (*p. ej.*, poli-His), o para mejorar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido se puede conjugar con una región Fc de inmunoglobulina o albúmina de suero bovino.

Un polipéptido puede estar conectado covalentemente o no covalentemente a una secuencia de aminoácidos a la que el polipéptido no está normalmente asociada en la naturaleza. Además, un polipéptido puede estar conectado covalentemente o no covalentemente a compuestos o moléculas distintas de aminoácidos. Por ejemplo, un polipéptido puede estar conectado a un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un conector de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de parada de la transferencia, un dominio transmembrana, un

ligando de purificación de proteína, o una combinación de los mismos. En una realización de la invención un ligando de purificación de proteína puede ser uno o más residuos de aminoácidos C en, por ejemplo, el extremo amino o el extremo carboxi de un polipéptido de la invención. Un espaciador de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos que normalmente no se asocian con un polipéptido de la invención en la naturaleza. Un espaciador de aminoácidos puede comprender aproximadamente 1, 5, 10, 20, 100, o 1.000 aminoácidos.

Si se desea, un polipéptido puede ser una proteína de fusión, que también puede contener otras secuencias de aminoácidos, tales como conectores de aminoácidos, espaciadores de aminoácidos, secuencias señal, secuencias de parada de la transferencia TMR, dominios transmembrana, así como ligandos útiles en la purificación de proteínas, tales como glutatión-S-transferasa, etiqueta de histidina, y proteína A estafilocócica, o combinaciones de los mismos. En una proteína de fusión puede estar presente más de un polipéptido de la invención. Los fragmentos de polipéptidos de la invención pueden estar presentes en una proteína de fusión de la invención. Una proteína de fusión de la invención puede comprender uno o más polipéptidos que se muestran en el SEQ ID NO: 10, o fragmentos de los mismos.

Los polipéptidos de la invención pueden estar en una forma multimérica. Es decir, un polipéptido puede comprender una o más copias del SEQ ID NO: 10. Un polipéptido multimérico puede ser un péptido antigénico múltiple (MAP). Véase *p. ej.*, Tam, J. Immunol. Methods, 196: 17-32 (1996).

Los polipéptidos de la invención pueden comprender un antígeno que es reconocido por un anticuerpo reactivo contra *E. Canis*. El antígeno puede comprender uno o más epítomos (*es decir*, determinantes antigénicos). Un epítomo puede ser un epítomo lineal, un epítomo secuencial o un epítomo conformacional. Los epítomos dentro de un polipéptido de la invención pueden ser identificados por medio de varios métodos. Véase, *p. ej.*, la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.554.101; Jameson y Wolf, CABIOS 4: 181-186 (1988). Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede ser aislado y escrutado. Se puede preparar por medio de escisión proteolítica una serie de péptidos cortos, que juntos abarcan una secuencia de polipéptido completa. Comenzando por ejemplo, con fragmentos de polipéptido de 100 unidades, cada fragmento se puede someter a ensayo para determinar la presencia de epítomos reconocidos en un ELISA. Por ejemplo, en un análisis ELISA un polipéptido de *E. canis*, tal como un fragmento polipeptídico de 100 unidades, está anclado a un soporte sólido, tal como los pocillos de una placa de múltiples pocillos de plástico. Una población de anticuerpos se marca, se añade al soporte sólido y se deja que se una al antígeno no marcado, en condiciones en las que se bloquea la absorción no específica, y cualquier anticuerpo no unido y otras proteínas se lavan. La unión del anticuerpo se detecta, por ejemplo, por medio de una reacción que convierte un sustrato incoloro en un producto de reacción coloreado. Después se pueden someter a ensayo fragmentos progresivamente más pequeños y solapantes, a partir de un oligómero de 100 unidades identificado para mapear el epítomo de interés.

En una realización de la invención, un antígeno DIVA comprende un epítomo o región inmunodominante. Es decir, un epítomo o región que induce y se une con mayor frecuencia a anticuerpos en una población de los mismos cuando se compara con otros epítomos. Un antígeno puede tener uno o más epítomos inmunodominantes. Los epítomos inmunodominantes se pueden mapear, por ejemplo, sobre un polipéptido después de que el polipéptido se haya administrado a un animal o antes de semejante administración. Véase *p. ej.*, la Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2004/0209324.

Un polipéptido de la invención se puede producir de forma recombinante. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención se puede introducir en un vector de expresión recombinante, que se puede expresar en un sistema de células anfitrionas de expresión adecuado utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica. Se encuentra disponible en la técnica una variedad de sistemas de expresión de bacterias, levaduras, plantas, mamíferos, e insectos y se puede utilizar cualquiera de tales sistemas de expresión. Opcionalmente, un polinucleótido que codifica un polipéptido se puede traducir en un sistema de traducción libre de células. Un polipéptido también se puede sintetizar químicamente u obtener a partir de células de *E. canis*.

Un polipéptido inmunogénico de la invención comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 10. Un polipéptido inmunogénico puede inducir anticuerpos u otras respuestas inmunitarias (*p. ej.*, respuestas de las células T del sistema inmunitario) que reconocen epítomos de polipéptidos que tienen el SEQ ID NO: 10. Un polipéptido inmunogénico de la invención también puede ser un fragmento de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 10. Un fragmento de un polipéptido inmunogénico de la invención puede tener aproximadamente 6, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 250, 500, 750 aminoácidos de longitud.

Los anticuerpos específicos para *E. canis* se pueden detectar en los fluidos o tejidos biológicos por medio de cualquier método conocido en la técnica. Los métodos más simples son generalmente los métodos de inmunoanálisis. Uno de tales métodos es un método basado en la competición en el que las muestras de suero se incuban previamente con un antígeno de *E. canis* que no es un elemento de una vacuna de *E. canis* (*p. ej.*, un antígeno DIVA de *E. canis*), y después se añaden a una fase sólida, tal como una placa de microtitulación, que tiene un anticuerpo monoclonal inmovilizado específico para el antígeno DIVA de *E. canis*. Los anticuerpos específicos para el antígeno DIVA de *E. canis* en la muestra impedirán que el antígeno DIVA de *E. canis* se una al anticuerpo inmovilizado. La detección de cualquier unión del antígeno DIVA de *E. canis* al anticuerpo inmovilizado se puede

determinar mediante la adición de un segundo compañero de unión al antígeno de *E. canis*, ya sea directamente marcado ya sea susceptible de convertirse en marcado por medio de la unión a otro compañero de unión que tenga una marca. Una muestra positiva, es *decir* una muestra que tenga anticuerpos específicos para un antígeno DIVA de *E. canis* se asocia con una disminución de la señal desde la marca.

- 5 En una realización concreta, los anticuerpos para un antígeno DIVA de *E. canis* en una muestra biológica se pueden detectar poniendo en contacto la muestra con un antígeno DIVA de *E. canis* y añadiendo la muestra a una placa de microtitulación recubierta con un anticuerpo monoclonal anti-antígeno DIVA. La unión del antígeno DIVA a la placa de microtitulación se puede detectar mediante la adición de un anticuerpo policlonal de conejo contra el antígeno DIVA y la adición de un anticuerpo policlonal de burro anti-conejo conjugado con HRP. Los anticuerpos de la muestra evitarán la unión del antígeno DIVA al anticuerpo inmovilizado, causando de ese modo una disminución de la señal.

- 15 Otro método para la detección de anticuerpos específicos para un antígeno DIVA de *E. Canis* es un análisis sándwich, donde una muestra biológica sospechosa de contener un anticuerpo específico para un antígeno DIVA de *E. canis* se pone en contacto con un antígeno DIVA inmovilizado de *E. canis* para formar un complejo inmunológico. La presencia de un anticuerpo específico para un antígeno DIVA de *E. canis* se determina mediante la detección de la unión de un compañero de unión marcado para el anticuerpo de *E. canis*, tal como un segundo anticuerpo.

- 20 En un aspecto de la invención, los antígenos DIVA de *E. canis* se pueden inmovilizar sobre un soporte sólido adecuado. Una muestra biológica se pone en contacto con el antígeno DIVA de *E. canis*, al que se unen los anticuerpos anti-*E. canis*, si dichos anticuerpos están presentes en la muestra. La unión puede ser detectada por cualquier medio adecuado, p. ej., enzimas, radionúclidos, partículas o marcas fluorescentes. En una realización adecuada, el reactivo de detección se puede asociar con una proteína que es la misma o similar a la que se utiliza para capturar anticuerpos anti-*E. canis* (si están presentes). En una realización concreta, los anticuerpos contra *E. canis* pueden ser detectados mediante la inmovilización de un antígeno de *E. canis* sobre un soporte sólido. Las muestras biológicas se pueden poner en contacto con el soporte sólido y, después de la extracción de la muestra no unida, se puede lograr la unión de los anticuerpos contra *E. canis* al antígeno, por ejemplo, con un anticuerpo IgG marcado.

- 30 Los antígenos DIVA de la invención también pueden comprender mimótopos de antígenos DIVA de la invención. Un mimótopo es un epitopo peptídico aleatorio que imita un epitopo antigénico natural durante la presentación del epitopo. Los epitopos peptídicos aleatorios pueden ser identificados generando o seleccionando una biblioteca de epitopos peptídicos aleatorios. La biblioteca se pone en contacto con un anticuerpo. Se identifican los mimótopos que son específicamente inmunorreactivos con el anticuerpo. Las bibliotecas de péptidos aleatorios pueden presentarse, por ejemplo, en fagos o generarse en forma de bibliotecas combinatorias.

- 35 Los antígenos DIVA de *E. canis*, p. ej., polipéptidos, pueden ser naturales, es *decir*, aislados de una fuente natural, o pueden ser sintéticos (es *decir*, sintetizados químicamente o producidos de forma recombinante utilizando técnicas de ingeniería genética). Las proteínas naturales pueden ser aisladas de todas las bacterias por medio de técnicas convencionales, tales como la cromatografía de afinidad. Los anticuerpos policlonales o monoclonales se pueden utilizar para preparar una columna de afinidad adecuada por medio de técnicas bien conocidas.

- 40 Las proteínas que presentan reacciones cruzadas inmunológicas con una proteína de *E. Canis* natural pueden sintetizarse químicamente. Por ejemplo, se pueden sintetizar polipéptidos que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos, más habitualmente menos de aproximadamente 80 aminoácidos, y típicamente menos de aproximadamente 50 aminoácidos, por el método de síntesis en fase sólida conocido de Merrifield en el que se añaden secuencialmente aminoácidos a una cadena en crecimiento (Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc, 85: 2149-2156). También se pueden utilizar proteínas recombinantes. Estas proteínas pueden ser producidas mediante la expresión en células cultivadas de moléculas de ADN recombinante que codifican una parte deseada del genoma de *E. canis*. La parte del genoma de *E. canis* puede ser natural o sintética, con genes naturales obtenibles a partir de la bacteria aislada por medio de técnicas convencionales.

Polinucleótidos de E. canis

- 50 Los polinucleótidos descritos en la presente memoria contienen menos de un genoma microbiano completo y pueden ser ácidos nucleicos de hebra sencilla o de doble hebra. Un polinucleótido puede ser ARN, ADN, ADNc, ADN genómico, ARN o ADN sintetizado químicamente o combinaciones de los mismos. Los polinucleótidos se pueden purificar libres de otros componentes, tales como proteínas, lípidos y otros polinucleótidos. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser purificado en 50%, 75%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%. Los polinucleótidos codifican los polipéptidos descritos anteriormente. Los polinucleótidos pueden codificar un polipéptido mostrado en el SEQ ID NO: 10. Los polinucleótidos incluyen los que se muestran en el SEQ ID NO: 9. Los polinucleótidos pueden comprender otras secuencias de nucleótidos, tales como secuencias que codifican conectores, secuencias señal, secuencias de parada de la transferencia TMR, dominios transmembrana, o ligandos útiles en la purificación de proteínas tales como glutatión-S-transferasa, etiqueta de histidina, y proteína A estafilocócica.

Los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden ser aislados. Un polinucleótido aislado es un

polinucleótido que no es inmediatamente contiguo a una o ambas de las secuencias genómicas limítrofes 5' y 3' con las que está naturalmente asociado. Un polinucleótido aislado puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN recombinante de cualquier longitud, siempre que las secuencias de ácido nucleico encontradas de forma natural que flanquean inmediatamente la molécula de ADN recombinante en un genoma de origen natural se elimine o esté ausente. Los polinucleótidos aislados incluyen también moléculas de ácido nucleico de origen no natural. Una molécula de ácido nucleico existente entre los cientos a millones de otras moléculas de ácido nucleico dentro de, por ejemplo, bibliotecas de ADNc o genómicas, o cortes de gel que contienen un producto digerido con enzimas de restricción de ADN genómico no debe ser considerada un polinucleótido aislado. La secuencia de nucleótidos completa para *E. canis* se encuentra disponible, *por ejemplo*, en el número de acceso GenBank NCBI: NZ_AAEJ01000001.

Los polinucleótidos también pueden comprender fragmentos que codifican polipéptidos inmunogénicos. Los polinucleótidos pueden codificar polipéptidos completos, fragmentos de polipéptidos y polipéptidos variantes o de fusión.

Las secuencias de nucleótidos degeneradas que codifican los polipéptidos de la invención, así como las secuencias de nucleótidos homólogas que son idénticas al menos aproximadamente en 80, o aproximadamente en 90, 96, 98, o 99% a las secuencias de polinucleótidos y los complementos de las mismas también se describen en la presente memoria. El porcentaje de identidad de secuencia se puede calcular como se describe en la sección "Polipéptidos". Las secuencias de nucleótidos degenerados son polinucleótidos que codifican un polipéptido de la invención o fragmentos de los mismos, pero difieren en la secuencia de ácido nucleico a partir de la secuencia de polinucleótidos de tipo salvaje, debido a la degeneración del código genético. Las moléculas de ADN complementario (ADNc), homólogos de especie, y variantes de polinucleótidos de *E. canis* que codifican polipéptidos de *E. canis* biológicamente funcionales también son polinucleótidos de *E. canis*. Los polinucleótidos se pueden aislar a partir de secuencias de ácido nucleico presentes, por ejemplo, en una muestra biológica, tal como sangre, suero, saliva, o tejido de un individuo infectado. Los polinucleótidos también se pueden sintetizar en el laboratorio, por ejemplo, usando un sintetizador automático. Se puede utilizar un método de amplificación tal como la PCR para amplificar polinucleótidos de cualquier ADN genómico o ADNc que codifique los polipéptidos.

Los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden comprender secuencias codificantes para los polipéptidos de origen natural o pueden codificar secuencias alteradas que no existen en la naturaleza. Si se desea, los polinucleótidos se pueden clonar en un vector de expresión que comprende elementos de control de la expresión, incluyendo por ejemplo, orígenes de replicación, promotores, intensificadores, u otros elementos reguladores que dirigen la expresión de los polinucleótidos en células anfitrionas. Un vector de expresión puede ser, por ejemplo, un plásmido, tal como pBR322, pUC, o ColE1, o un vector de adenovirus, tal como un vector de adenovirus de Tipo 2 o un vector de Tipo 5. Opcionalmente, se pueden utilizar otros vectores, incluyendo pero no limitados a virus Sindbis, virus de simios 40, vectores de alfavirus, vectores de poxvirus, y citomegalovirus y vectores retrovirales, tales como virus de sarcoma murino, virus del tumor mamario de ratón, virus de la leucemia murina de Moloney, y virus del sarcoma de Rous. También se pueden utilizar minicromosomas tales como MC y MCI, bacteriófagos, fagémidos, cromosomas artificiales de levadura, cromosomas artificiales bacterianos, partículas de virus, partículas similares a virus, cósmidos (plásmidos en los que se han insertado sitios cos del fago lambda) y replicones (elementos genéticos que son susceptibles de replicación bajo su propio control en una célula).

Los métodos para preparar polinucleótidos conectados operablemente a una secuencia de control de la expresión y expresarlos en una célula anfitriona son bien conocidos en la técnica. Véase, *p. ej.*, la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.366.246. Un polinucleótido está conectado operablemente cuando está colocado adyacente a o cerca de uno o más elementos de control de la expresión, que dirigen la transcripción y/o la traducción del polinucleótido.

Los polinucleótidos se pueden utilizar, por ejemplo, como sondas o cebadores, por ejemplo cebadores de PCR, para detectar la presencia de polinucleótidos de *E. canis* en una muestra, tal como una muestra biológica. La capacidad de tales sondas y cebadores para hibridar específicamente con secuencias de polinucleótidos de *E. canis* les permitirá ser de utilidad en la detección de la presencia de secuencias complementarias en una muestra dada. Las sondas y los cebadores de polinucleótidos pueden hibridar con las secuencias complementarias en una muestra tal como una muestra biológica, incluyendo saliva, esputo, sangre, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, exudado de heridas, o tejido. Los polinucleótidos de la muestra pueden ser, por ejemplo, sometidos a electroforesis en gel u otras técnicas de separación por tamaño o puede ser inmovilizados sin separación por tamaños. Las sondas o cebadores de polinucleótidos pueden estar marcados. Las marcas adecuadas, y los métodos para marcar sondas y cebadores son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, marcas radiactivas incorporadas por medio de traslados de muescas o por medio de quinasa, marcas de biotina, marcas fluorescentes, marcas quimioluminiscentes, marcas bioluminiscentes, marcas de quelantes metálicos y marcas enzimáticas. Los polinucleótidos de la muestra se ponen en contacto con las sondas o los cebadores en condiciones de hibridación de restricción adecuada.

Dependiendo de la aplicación, se pueden utilizar condiciones variables de hibridación para conseguir grados variables de selectividad de la sonda o el cebador hacia la secuencia diana. Para aplicaciones que requieren una alta selectividad, se pueden utilizar condiciones relativamente restrictivas, tales como condiciones de baja concentración de sal y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por una concentración de sal de

aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,15 M a temperaturas de aproximadamente 50°C a aproximadamente 70°C. Para aplicaciones que requieren menos selectividad, se pueden utilizar condiciones de hibridación menos restrictivas. Por ejemplo, condiciones de concentración de sal de aproximadamente 0,14 M a aproximadamente 0,9 M, a temperaturas que varían desde aproximadamente 20°C a aproximadamente 55°C. La presencia de un complejo hibridado que comprende la sonda o el cebador y un polinucleótido complementario de la muestra de ensayo indica la presencia de *E. canis* o una secuencia de polinucleótidos de *E. canis* en la muestra.

Anticuerpos

Los anticuerpos descritos en la presente memoria son moléculas de anticuerpo que se unen específicamente y de forma estable a un polipéptido de *E. canis* de la invención o a un fragmento del mismo. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), o un fragmento de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos son una porción de un anticuerpo intacto que comprende el sitio de unión al antígeno o la región variable de un anticuerpo intacto, en donde la porción está libre de los dominios constantes de la cadena pesada de la región Fc del anticuerpo intacto. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ y F_v.

Un anticuerpo puede ser cualquier clase de anticuerpo, incluyendo, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Un anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo de un polipéptido de la invención. Un anticuerpo se puede elaborar in vivo en animales de laboratorio adecuados o in vitro utilizando técnicas de ADN recombinante. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., Dean, *Methods Mol. Biol.* 80:23-37 (1998); Dean, *Methods Mol. Biol.* 32:361-79 (1994); Baileg, *Methods Mol. Biol.* 32:381-88 (1994); Gullick, *Methods Mol. Biol.* 32:389-99 (1994); Drenckhahn et al. *Methods Cell. Biol.* 37:7-56 (1993); Morrison, *Ann. Rev. Immunol.* 10:239-65 (1992); Wright et al. *Crit. Rev. Immunol.* 12:125-68 (1992). Por ejemplo, los anticuerpos policlonales se pueden producir mediante la administración de un polipéptido de la invención a un animal, tal como un ser humano u otro primate, ratón, rata, conejo, cobaya, cabra, cerdo, perro, vaca, oveja, burro, o un caballo. El suero del animal inmunizado se recoge y se purifican los anticuerpos del plasma mediante, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, seguido de cromatografía, tal como cromatografía de afinidad. Los mecanismos para producir y procesar anticuerpos policlonales son conocidos en la técnica.

"Se une específicamente" o "específico para" significa que un antígeno, p. ej., un polipéptido, reconoce y se une a un anticuerpo con mayor afinidad que a otras moléculas, no específicas. Por ejemplo, un anticuerpo generado contra un antígeno (p. ej., un polipéptido) al que se une más eficazmente que a una proteína no específica puede describirse como de unión específica al antígeno. La unión específica se puede someter a ensayo usando, por ejemplo, un análisis inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), un radioinmunoanálisis (RIA), o un análisis de transferencia de Western usando metodología bien conocida en la técnica.

Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítopos presentes sobre un antígeno, p. ej., un polipéptido de la invención, también se pueden producir fácilmente. Por ejemplo, las células B normales de un mamífero, tal como un ratón, que fue inmunizado con un polipéptido de la invención se pueden fusionar con, por ejemplo, células de mieloma de ratón sensibles a HAT para producir hibridomas. Los hibridomas que producen anticuerpos específicos de *E. canis* se pueden identificar utilizando RIA o ELISA y aislar por medio de clonación en agar semi-sólido o por dilución limitante. Los clones que producen anticuerpos específicos de *E. canis* se aíslan mediante otra ronda de escrutinio. Los anticuerpos monoclonales pueden ser escrutinados para determinar la especificidad usando técnicas convencionales, por ejemplo, mediante la unión de un polipéptido de la invención a una placa de microtitulación y la medición de la unión del anticuerpo monoclonal mediante un análisis ELISA. Los mecanismos para producir y procesar anticuerpos monoclonales son conocidos en la técnica. Véase p. ej., Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). Se pueden preparar directamente isotipos concretos de un anticuerpo monoclonal, seleccionando entre la fusión inicial, o se pueden preparar secundariamente, a partir de un hibridoma parental que secreta un anticuerpo monoclonal de un isotipo diferente mediante el uso de una técnica de selección sib para aislar las variantes de cambio de clase. Véanse Steplewski et al., *P.N.A.S. U.S.A.* 82:8653 1985; Spria et al., *J. Immunolog. Meth.* 74:307, 1984. Los anticuerpos monoclonales también pueden ser anticuerpos monoclonales recombinantes. Véanse, p. ej. la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.474.893; la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567. Los anticuerpos también pueden ser construidos químicamente. Véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.676.980.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.482.856), humanizados (véanse, p. ej., Jones et al., *Nature* 321: 522 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332: 323 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593 (1992)), o humanos. Los anticuerpos humanos se pueden elaborar, por ejemplo, mediante inmortalización directa, presentación en fagos, ratones transgénicos, o una metodología Trimerica, véase p. ej., Reisener et al., *Trends Biotechnol.* 16:242-246 (1998).

Los anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de *E. canis* (p. ej., polipéptidos de *E. canis* mostrados en los SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17), son particularmente útiles para detectar la presencia de *E. canis* o antígenos de *E. canis* en una muestra, tal como una muestra de suero, sangre, orina o saliva de un animal infectado con *E. canis* tal como un humano o un perro. Un inmunoanálisis para *E. canis* o un antígeno de *E. canis* puede utilizar un anticuerpo o varios anticuerpos. Un inmunoanálisis para *E. canis* o un antígeno de *E. canis* puede utilizar,

por ejemplo, un anticuerpo monoclonal dirigido a un epítipo de *E. canis*, una combinación de anticuerpos monoclonales dirigidos a epítipos de un polipéptido de *E. canis*, anticuerpos monoclonales dirigidos a epítipos de diferentes polipéptidos de *E. canis*, anticuerpos policlonales dirigidos al mismo antígeno de *E. canis*, anticuerpos policlonales dirigidos a diferentes antígenos de *E. canis*, o una combinación de anticuerpos monoclonales y policlonales. Los protocolos de inmunoanálisis se pueden basar, por ejemplo, en análisis de competición, de reacción directa, o de tipo sándwich utilizando, por ejemplo, un anticuerpo marcado. Los anticuerpos se pueden marcar con cualquier tipo de marca conocida en la técnica, incluyendo, por ejemplo, marcas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas, enzimáticas, de metales coloidales, radioisotópicas y bioluminiscentes.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden unir a un soporte y se pueden utilizar para detectar la presencia de *E. canis* o un antígeno de *E. canis*, *p. ej.*, un antígeno DIVA de *E. canis* o un antígeno no DIVA de *E. canis*. Los soportes incluyen, por ejemplo, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magletita.

Los anticuerpos se pueden utilizar adicionalmente para aislar organismos de *E. canis* o antígenos de *E. canis* por medio de columnas de inmutafinidad. Los anticuerpos se pueden fijar a un soporte sólido mediante, por ejemplo, adsorción o por medio de enlaces covalentes de modo que los anticuerpos conservan su actividad inmunoselectiva. Opcionalmente, se pueden incluir grupos espaciadores de manera que el sitio de unión al antígeno del anticuerpo permanezca accesible. Los anticuerpos inmovilizados se pueden utilizar después para unirse a organismos de *E. canis* o a antígenos de *E. canis* de una muestra, tal como una muestra biológica incluyendo saliva, suero, esputo, sangre, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, exudado de heridas, o tejido. Los organismos de *E. canis* o los antígenos de *E. canis* se recuperan de la matriz de la columna, por ejemplo, por medio de un cambio en el pH.

Los anticuerpos también se pueden utilizar en estudios de inmunolocalización para analizar la presencia y distribución de un polipéptido de la invención durante diversos eventos celulares o condiciones fisiológicas. Los anticuerpos también se pueden utilizar para identificar moléculas que participan en la inmunización pasiva y para identificar moléculas que participan en la biosíntesis de los antígenos no proteicos. La identificación de tales moléculas puede ser útil en el desarrollo de vacunas. Los anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos monoclonales y anticuerpos de cadena sencilla, se pueden utilizar para controlar el transcurso del alivio de una enfermedad causada por *E. canis*. Al medir el aumento o la disminución de anticuerpos de *E. canis* contra antígenos de *E. canis* en una muestra de ensayo de un animal, se puede determinar si un régimen terapéutico concreto, destinado a mejorar el trastorno es eficaz. Los anticuerpos se pueden detectar y/o cuantificar utilizando, por ejemplo, análisis de unión directa, tales como RIA, ELISA, o análisis de transferencia Western.

Detección

Los métodos de la invención se pueden llevar a cabo utilizando, por ejemplo, mecanismos de inmunoanálisis bien conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, el uso de microplacas y dispositivos de flujo lateral. En una realización, se inmovilizan uno o más antígenos DIVA de *E. canis* sobre un soporte sólido en una ubicación distinta. La detección de complejos de antígeno-anticuerpo sobre el soporte sólido puede ser mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.726.010 describe un ejemplo de un dispositivo de flujo lateral útil en la presente invención. El dispositivo se puede utilizar para detectar uno o más anticuerpos para antígenos de *E. canis*.

La inmovilización de uno o más reactivos de captura de analito, *p. ej.*, polipéptidos de *E. canis*, sobre un dispositivo o soporte sólido se realiza de modo que el reactivo de captura de analito no sea arrastrado por la muestra, el diluyente y/o los procedimientos de lavado. Se pueden anclar uno o más reactivos de captura de analito a una superficie mediante adsorción física (*es decir*, sin la utilización de conectores químicos) o por medio de unión química (*es decir*, con la utilización de conectores químicos). La unión química puede generar un anclaje más fuerte de los reactivos de captura sobre una superficie y proporcionar una orientación definida y una conformación de las moléculas unidas a la superficie.

En la presente memoria se describe un dispositivo que es adecuado para un análisis de flujo lateral. Por ejemplo, se añade una muestra de ensayo a una matriz de flujo en una primera región (una zona de aplicación de la muestra). La muestra de ensayo es llevada en un lecho de flujo fluido por acción capilar a una segunda región de la matriz de flujo donde una marca es capaz de unirse y formar un primer complejo con un analito en la muestra de ensayo. El primer complejo se lleva a una tercera región de la matriz de flujo donde un polipéptido de *E. canis* se inmoviliza en una ubicación distinta. Se forma un segundo complejo entre un polipéptido inmovilizado y el primer complejo que incluye el anticuerpo de la muestra. Por ejemplo, un primer complejo que comprende una partícula de sol de oro y un polipéptido de *E. canis* unido a un anticuerpo de *E. canis* se unirán específicamente y formarán un segundo complejo con un segundo polipéptido de *E. canis* inmovilizado o con un segundo anticuerpo dirigido a anticuerpos de *E. canis*. La marca que forma parte del segundo complejo se puede visualizar directamente.

Se describen en la presente memoria uno o más reactivos de unión específica marcados que pueden mezclarse con una muestra de ensayo antes de la aplicación a un dispositivo descrito en la presente memoria. En este caso, no es necesario haber marcado los reactivos de unión específica depositados y secados sobre una tira de reactivo de

unión específica en el dispositivo. Un reactivo de unión específica marcado, ya sea añadido a una muestra de ensayo o depositado previamente sobre el dispositivo, puede ser, por ejemplo, un anticuerpo marcado que se une específicamente a un anticuerpo para *E. canis*.

5 Cualquiera o todas las realizaciones anteriores se puede proporcionar en forma de un kit. En un ejemplo concreto, semejante kit incluiría un dispositivo completo con reactivos de unión específica (p. ej., un reactivo de unión específica marcado no inmovilizado y un reactivo de captura de analito inmovilizado) y un reactivo de lavado, así como un reactivo detector y reactivos de control positivo y negativo, si se desea o es apropiado. Además, se pueden incluir otros aditivos, tales como estabilizantes, tampones, y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden ser variadas, para proporcionar concentraciones en disolución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del análisis. Concretamente, los reactivos se pueden proporcionar en forma de polvos secos, habitualmente liofilizados, que en disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tenga las concentraciones apropiadas para combinarlos con una muestra.

15 Un antígeno DIVA de *E. canis*, p. ej., un polipéptido, puede ser un reactivo de captura de analito inmovilizado en una zona de reacción (fase sólida). Un segundo reactivo de captura de analito, p. ej., un anticuerpo anti-IgG o anti-IgM, que ha sido conjugado con una marca, o bien puede ser añadido a la muestra antes de añadir la muestra al dispositivo, o bien el segundo reactivo de captura del analito puede ser incorporado al dispositivo. Por ejemplo, el reactivo de unión específica marcado puede ser depositado y secado sobre un lecho de flujo fluido que proporciona comunicación de fluido entre la zona de aplicación de la muestra y la fase sólida. El contacto del reactivo de unión específica marcado con la muestra de fluido da como resultado la disolución del reactivo de unión específica marcado.

20 El dispositivo también puede incluir un reactivo líquido que transporta el material no unido (p. ej., una muestra de fluido que no ha reaccionado y reactivos de unión específica no unidos) lejos de la zona de reacción (fase sólida). Un reactivo líquido puede ser un reactivo de lavado y servir solamente para eliminar el material no unido de la zona de reacción, o puede incluir un reactivo detector y servir tanto para eliminar el material no unido como para facilitar la detección del analito. Por ejemplo, en el caso de un reactivo de unión específica conjugado con una enzima, el reactivo detector incluye un sustrato que produce una señal detectable tras la reacción con el producto conjugado de enzima-anticuerpo en la zona reactiva. En el caso de un reactivo de unión específica marcado conjugado con una molécula radiactiva, fluorescente o absorbente de luz, el reactivo detector actúa simplemente como una solución de lavado facilitando la detección de la formación del complejo en la zona reactiva mediante el lavado del reactivo marcado no unido.

Pueden estar presentes dos o más reactivos líquidos en un dispositivo, por ejemplo, un dispositivo puede comprender un reactivo líquido que actúa como un reactivo de lavado y un reactivo líquido que actúa como un reactivo detector y facilita la detección del analito.

35 Un reactivo líquido puede incluir adicionalmente una cantidad limitada de un "inhibidor", es decir, una sustancia que bloquea el desarrollo del producto final detectable. Una cantidad limitada es una cantidad de inhibidor suficiente para bloquear el desarrollo del producto final hasta que la mayoría o todo el exceso de material no unido se transporta lejos de la segunda región, momento en el que se produce el producto final detectable.

Métodos de tratamiento, alivio o prevención de una enfermedad causada por *E. canis*

40 Se puede utilizar un polipéptido DIVA, un polinucleótido o un anticuerpo descritos en la presente memoria para tratar, aliviar o prevenir una enfermedad causada por *E. canis*. Sin embargo, si se utiliza un polipéptido DIVA para tratar, aliviar o prevenir una enfermedad causada por *E. canis*, éste no podría, a partir de entonces, ser utilizado como polipéptido DIVA para la detección y diferenciación de los animales infectados, no vacunados, y vacunados porque el sistema inmunológico de un animal vacunado reconocería el antígeno DIVA utilizado para la vacunación. Sin embargo, un polipéptido DIVA que no presenta reacción cruzada con anticuerpos para el polipéptido DIVA utilizado para el tratamiento, alivio o prevención de una enfermedad causada por *E. canis* todavía puede ser utilizado como un antígeno DIVA de *E. canis*.

45 Por ejemplo, si el SEQ ID NO: 2 o un fragmento del mismo se utiliza como una vacuna, en ese caso se pueden utilizar los SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17 o combinaciones de los mismos como un polipéptido DIVA, si no presentan reacción cruzada con anticuerpos específicos para el SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, los polipéptidos DIVA, polinucleótidos, y anticuerpos se pueden utilizar de dos maneras diferentes: (1) en forma de composiciones para la prevención, tratamiento, o alivio de una enfermedad o infección causada por *E. canis*; y (2) en forma de un antígeno DIVA de *E. canis* para la detección y diferenciación de animales que están vacunados; no vacunados; infectados o no infectados con *E. canis*.

55 Los polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para tratar, aliviar o prevenir una enfermedad causada por *E. canis*. Por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal o fragmentos del mismo, se puede administrar a un animal, tal como un ser humano. Un anticuerpo o fragmento del mismo se puede administrar a un animal en una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de

un anticuerpo o fragmentos del mismo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad eficaz en el alivio de los síntomas de la infección por *E. canis* o en la reducción de la cantidad de organismos de *E. canis* en un sujeto.

Los polipéptidos o polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden estar presentes en una composición inmunogénica y utilizarse para provocar una respuesta inmunitaria en un anfitrión. Una composición inmunogénica es capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un animal. Una composición inmunogénica de polipéptidos o polinucleótidos es particularmente útil en la sensibilización de un sistema inmunitario de un animal de manera que, como resultado, se produce una respuesta inmunitaria que alivia o previene el efecto de la infección por *E. canis*. El desencadenamiento de una respuesta inmunitaria en un modelo animal puede resultar de utilidad para determinar, por ejemplo, las dosis o las rutas de administración óptimas. El desencadenamiento de una respuesta inmunitaria también puede ser utilizado para tratar, prevenir, o aliviar una enfermedad o infección causadas por *E. canis*. Una respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias humorales o respuestas inmunitarias mediadas por células, o una combinación de las mismas. Una respuesta inmunitaria puede comprender también la promoción de una respuesta generalizada del anfitrión, p. ej., mediante la promoción de la producción de defensas.

La generación de un título de anticuerpos por un animal contra *E. canis* puede ser importante en la protección frente a la infección y el aclaramiento de la infección. La detección y/o la cuantificación de los títulos de anticuerpos después de la liberación de un polipéptido o polinucleótido se pueden utilizar para identificar epítomos que son particularmente eficaces en la obtención de los títulos de anticuerpos. Los epítomos responsables de una fuerte respuesta de anticuerpos a *E. canis* se pueden identificar mediante la obtención de anticuerpos dirigidos contra polipéptidos de *E. canis* de diferentes longitudes. Los anticuerpos provocados por un epítomo de polipéptido en particular, se pueden someter a ensayo a continuación usando, por ejemplo, un análisis ELISA para determinar qué polipéptidos contienen epítomos que son los más eficaces en la generación de una respuesta fuerte. Los polipéptidos o proteínas de fusión que contienen estos epítomos o los polinucleótidos que codifican los epítomos pueden ser construidos y utilizados a continuación para provocar una respuesta de anticuerpos fuerte.

Un polipéptido, polinucleótido, o anticuerpo descritos en la presente memoria se pueden administrar a un mamífero, tal como un ratón, conejo, cobaya, macaco, babuino, chimpancé, ser humano, vaca, oveja, cerdo, caballo, perro, gato, o a animales tales como pollos o patos, para provocar anticuerpos *in vivo*. La inyección de un polinucleótido tiene las ventajas prácticas de la simplicidad de la construcción y la modificación. Además, la inyección de un polinucleótido da como resultado la síntesis de un polipéptido en el anfitrión. Por lo tanto, el polipéptido se presenta al sistema inmunitario del anfitrión con las modificaciones post-traduccionales, la estructura y la conformación nativas. Un polinucleótido puede ser liberado en un sujeto en forma de "ADN desnudo".

La administración de un polinucleótido, polipéptido o anticuerpo puede ser por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo inyección intramuscular, intravenosa, intrapulmonar, intradérmica, intraperitoneal, o subcutánea, aerosol, administración intranasal, bomba de infusión, supositorio, administración por la mucosa, tópica, y oral, incluyendo la inyección usando una pistola balística biológica ("pistola de genes"). Un polinucleótido, polipéptido, o anticuerpo pueden estar acompañados por un portador de proteína para la administración oral. También se puede utilizar una combinación de métodos de administración para provocar una respuesta inmunitaria. Los anticuerpos pueden ser administrados a una dosis diaria de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 200 mg. En una realización se administran los anticuerpos a una dosis diaria de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mg.

Los portadores y diluyentes para uso terapéutico farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro ed. (1985)). El portador en sí no debería inducir la producción de anticuerpos perjudiciales para el anfitrión. Tales portadores incluyen, pero no se limitan a, grandes macromoléculas, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polisacáridos tales como SEFAROSA[®] funcionalizada con látex, agarosa, celulosa, cuentas de celulosa y similares, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos tales como poli(ácido glutámico), polilisina, y similares, copolímeros de aminoácidos, peptoides, lipitoides y partículas de virus o células bacterianas, avirulentas inactivas. Los liposomas, hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables, y bioadhesivos también se pueden utilizar como portadores para una composición.

Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden utilizar en las composiciones descritas en la presente memoria, por ejemplo, sales minerales tales como hidroclozuros, hidrobromuros, fosfatos, o sulfatos, así como sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, o benzoatos. Los sustratos proteicos especialmente útiles son albúminas de suero, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico, y otras proteínas bien conocidas por los expertos en la técnica. Las composiciones también pueden contener líquidos o excipientes, tales como agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de Hank, glucosa, glicerol, dextrosa, maltodextrina, etanol, o similares, solos o combinados, así como sustancias tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de ajuste de la tonicidad, detergentes, o agentes tamponadores del pH. También se pueden utilizar agentes activos adicionales, tales como agentes bactericidas.

Si se desea, se pueden incluir moléculas coestimuladoras, que mejoran la presentación del inmunógeno a los linfocitos, tales como B7-1 o B7-2, o citoquinas tales como MIP1 α , GM-CSF, IL-2 e IL-12, en una composición descrita en la presente memoria. Opcionalmente, también se pueden incluir coadyuvantes en una composición. Los

coadyuvantes son sustancias que se pueden utilizar para aumentar de forma no específica una respuesta inmunitaria específica. En general, un coadyuvante y un polipéptido de la invención se mezclan antes de la presentación al sistema inmunitario, o se presentan por separado, pero se presentan en el mismo sitio del animal. Los coadyuvantes pueden incluir, por ejemplo, coadyuvantes oleosos (p. ej., coadyuvantes completo e incompleto de Freund), sales minerales (p. ej., $Al_2(SO_4)_3$, $AlNa(SO_4)_2$, $AlNH_4(SO_4)$, Sílice, Alumbre, $Al(OH)_3$ y $Ca_3(PO_4)_2$), polinucleótidos (es decir, ácidos poli-IC y poli-AU), y ciertas sustancias naturales (p. ej., cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, así como sustancias que se encuentran en *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis* y miembros del género *Brucella*). Los coadyuvantes que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a MF59-0, hidróxido de aluminio, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637), denominada nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (CGP 19835 A, denominado MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (MPL + TDM + CWS) en una emulsión de escualeno al 2%/Tween[®]80.

Las composiciones se pueden formular en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, formulaciones inyectables, colutorios, dentífricos, y similares. El porcentaje de uno o más polipéptidos, polinucleótidos o anticuerpos en tales composiciones y preparaciones puede variar de 0,1% a 60% del peso de la unidad.

La administración de polipéptidos, polinucleótidos o anticuerpos puede provocar una respuesta inmunitaria en el animal que dura al menos 1 semana, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, o más. Opcionalmente, una respuesta inmunitaria se puede mantener en un animal, proporcionando una o más inyecciones de refuerzo del polipéptido, polinucleótido, o anticuerpos en 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, o más después de la inyección primaria. Si se desea, también se pueden proporcionar moléculas co-estimuladoras o coadyuvantes antes, después o junto con las composiciones.

Una composición que comprende un polipéptido, polinucleótido, anticuerpo, o una combinación de los mismos se administra de una manera compatible con la composición concreta utilizada y en una cantidad que es eficaz para provocar una respuesta inmunitaria como se detecta, por ejemplo, por medio de un ELISA. Se puede inyectar un polinucleótido por vía intramuscular a un mamífero, tal como un babuino, chimpancé, perro, o ser humano, a una dosis de 1 ng/kg, 10 ng/kg, 100 ng/kg, 1.000 ng/kg, 0,001 mg/kg, 0,1 mg/kg, o 0,5 mg/kg. Se puede inyectar un polipéptido o anticuerpo por vía intramuscular a un mamífero a una dosis de 0,01, 0,05, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 5 o 10 mg/kg.

Los polipéptidos, polinucleótidos o anticuerpos, o una combinación de los mismos se pueden administrar a un animal que no está infectado con *E. canis* o se pueden administrar a un animal infectado con *E. canis*. Las dosificaciones concretas de polinucleótidos, polipéptidos o anticuerpos en una composición dependerán de muchos factores incluyendo, pero no limitados a la especie, la edad, el género, la medicación concurrente, el estado general del mamífero al que se administra la composición, y el modo de administración de la composición. Una cantidad eficaz de la composición de la invención se puede determinar fácilmente utilizando sólo experimentación de rutina.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de *E. canis* destruido con formalina para la inmunización en perros

Se hizo crecer *E. canis* en cultivo celular canino utilizando los métodos descritos en la bibliografía. Véase, p. ej., Breitschwerdt, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, Vol 42: 362-368. Utilizando la microscopía óptica, se estimó que 030 células estaban infectadas en más de 80% por *E. canis*. Se recogieron dos litros de cultivo celular infectado por *E. canis*, se centrifugaron y el sedimento se retuvo obteniéndose 7,31 g de material (peso húmedo). Se presume que el agua representaba 80% del peso del material, proporcionando un peso seco estimado de 1,462 g (20% del peso del material). El sedimento de células se resuspendió hasta 20 mg/ml en PBS (peso seco) para un volumen total de 73 ml.

A este sedimento celular resuspendido, se le añadieron 0,73 ml de solución de formalina (Catálogo Sigma Solución de formalina HT50-1-2 al 10%, tamponada neutra) para una concentración de formaldehído final de 0,04%. La solución se agitó durante la noche a 4°C. La mezcla inactivada se centrifugó y el sedimento celular se conservó. El sedimento se lavó por resuspensión en 250 ml de PBS. El material se recogió por centrifugación y el lavado se repitió una vez. El sedimento celular lavado se resuspendió en 73 ml de PBS. La muestra se dividió en alícuotas para 73 viales de tapa de rosca y se congeló a -80°C. Cada vial contiene 20 mg (peso seco) de cultivo celular de *E. canis* inactivado con formalina, adecuado para la combinación con el coadyuvante apropiado para la inmunización en animales.

Ejemplo 2

Preparación de *E. canis* fijado con formalina con dos coadyuvantes diferentes, protocolo para la inmunización de perros beagle con antígeno de *E. canis*, y ensayo de sueros de perros beagle inmunizados utilizando SNAP[®] 3Dx[®].

La preparación de antígeno con coadyuvante de hidróxido de aluminio es un mecanismo bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, véase "Antibodies, A Laboratory manual", Cold Spring Harbor Press, 1988, pág. 99.

5 Para la inmunización en perros (perros beagle de laboratorio), se prepararon dos conjuntos de dosis con coadyuvante de hidróxido de aluminio preparado como se describe más arriba y se prepararon dos conjuntos de dosis con coadyuvante Ribí (Corixa Corp., Seattle WA) utilizando el protocolo descrito por el fabricante. Cada dosis contenía aproximadamente 20 mg de cultivo celular de *E. canis* inactivado con formalina (peso seco).

10 Se seleccionaron perros beagle de laboratorio mantenidos en una perrera para la inmunización con antígeno inactivado con formalina de *E. canis*. A dos grupos de dos perros cada uno; utilizando cada grupo un coadyuvante diferente, se les administraron dosis de preparación de *E. canis* fijada con formalina (óxido de aluminio o Ribí). El día 0 se encontró que 4 perros eran sero-negativos utilizando tanto el diagnóstico SNAP(R) 3Dx(R), así como el análisis de transferencia Western utilizando el organismo *E. canis*.

15 El comité IACUC de Covance Research Products Inc. aprobó el protocolo para la inmunización de los perros beagle de laboratorio. Los perros fueron sensibilizados los días 0, 28 y 56 con tomas de muestras de sangre de 1 ml semanales que fueron controladas utilizando SNAP[®] 3Dx[®]. Todos los perros recibieron dosis con el artículo de ensayo apropiado por vía subcutánea en la zona dorsoescapular. Los cuatro animales fueron seroconvertidos a un ensayo positivo en *E. canis* SNAP[®] 3Dx[®] el día 42. Se tomaron muestras de sangre de la producción los días 42 y 70 (aproximadamente 50 ml de sangre que produjeron aproximadamente 25 ml de suero).

20 La Figura 1 muestra la evaluación con el SNAP[®] 3Dx[®] Assay de perros beagle de laboratorio. El dispositivo SNAP[®] se utilizó como describe el fabricante. La muestra "Pre" es del día 0. La muestra "Post" es del día 42. Las aplicaciones positivas para *E. canis* se convierten en positivas en los 4 perros para la muestra del día 42. Se observaron resultados similares para la muestra del día 70.

25 Los experimentos con una tercera vacuna que comprendía un tercer coadyuvante, BCG, (Calbiochem de EMD Biosciences, Inc. San Diego, CA) revelaron resultados similares. La preparación de la tercera vacuna fue idéntica a las preparaciones descritas para la vacuna con coadyuvante Ribí descrita anteriormente, excepto: 1) la inactivación con formalina fue durante 24 horas a 4°C, y 2) se añadió 1 mg de BCG. El programa de vacunación fue día 0, día 14, con tomas de sangre semanales analizadas para determinar la reactividad con proteínas de *E. canis*.

Ejemplo 3

Enriquecimiento de *E. canis* a partir del cultivo celular utilizando gradientes de PERCOLL[®].

30 Para el aislamiento de ADN y el análisis de transferencia Western, se enriqueció *E. canis* del cultivo celular utilizando gradientes de densidad de PERCOLL[®]. El procedimiento de aislamiento de patógenos intracelulares del cultivo de células, tales como *Ehrlichia*, es un mecanismo bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, véase Akira et al. (1982) Purification of Rickettsia tsutsugamushi by PERCOLL[®] density gradient centrifugation, Microbiol. Immunol., 26: 321-328.

35 Un enriquecimiento de *E. canis* típico se inició con 1,5 litros de cultivo de células infectadas (véase más arriba). Las células se centrifugaron a 6000 xg, el sedimento celular se conservó y el sobrenadante se descartó. El sedimento de células se resuspendió en 20 ml de PBS que estuvo seguido por una segunda centrifugación. El sobrenadante se descartó y el sobrenadante se conservó. A continuación, el sedimento se resuspendió en 20 ml de PBS, se sometió a sonicación durante 5 segundos a 20 kHz, se ajustó la potencia a 1,5 usando un sonicador Branson. La muestra se centrifugó a continuación a 500 xg durante 5 minutos para sedimentar los desechos grandes.

40 Se añadió PERCOLL[®] al sobrenadante a una concentración final de 32% (4,5 ml de PERCOLL[®] con 10 ml de muestra). La muestra se cargó en tubos de Oak Ridge compatibles con un rotor de ultracentrífuga 70,1 Ti, y se centrifugó durante 30 minutos a 63.000 x g. La banda opaca se recogió con una pipeta Pasteur. La banda opaca está altamente enriquecida en *Ehrlichia* (confirmado mediante microscopía óptica de la muestra recogida). Después de una dilución 1:4 con PBS, la muestra se dividió en alícuotas y se centrifugó a 12.000 x g. El sobrenadante fue descartado y el sedimento de *Ehrlichia* se almacenó a -80°C.

Ejemplo 4

Ensayo de suero o plasma de perros sensibilizados e infectados por medio de transferencia Western.

50 El uso del análisis en gel SDS-PAGE unidimensional y del análisis en gel bidimensional (1^a dimensión isoelectroenfoco, 2^a dimensión SDS-PAGE) es bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo véase Current Protocols in Molecular Biology, eds. F.M. Ausubel et al., John Wiley & Sons Inc., 1997, páginas 10.2.2-1.0.3.11. El uso de transferencias Western para analizar las proteínas separadas por medio de estos métodos es bien conocido para los expertos en la técnica. Por ejemplo véase Current Protocols in Molecular Biology, eds. F. M. Ausubel et. al., John Wiley & Sons Inc., 1997, páginas 10.8.1-10.8.116.

El trabajo inicial se realizó utilizando el análisis Western de proteínas separadas con geles 1D (datos no mostrados), seguido por análisis de Western de proteínas separadas usando geles 2D. Las proteínas de *E. canis* completa cosechadas de cultivo celular se analizaron utilizando la electroforesis en gel 2D (materiales y reactivos usados como describe el fabricante; Bio-Rad Life Sciences Research, Hercules, CA 94547). La cantidad de muestra que se iba a cargar por gel se determinó empíricamente (véase la Figura 2). Las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa y se sondearon utilizando sueros caninos de perros beagle de laboratorio el día 0, perros sensibilizados con antígeno de *E. canis* fijado con formalina (véase más arriba), o sueros de animales infectados con *E. canis* (véanse las Figuras 3, 4 y 5).

Se aislaron suero y plasma caninos positivos de perros infectados con *E. canis*. La infección con *E. canis* se verificó mediante análisis Western de los linfocitos cosechados a partir de sangre completa de estos perros, y se confirmó por medio del uso del análisis IDEXX SNAP[®]3Dx[®] con suero o plasma caninos (disponible comercialmente de IDEXX Laboratories Inc., que se utiliza como describe el fabricante).

Para el análisis de transferencia Western las proteínas se separaron con geles de SDS/PAGE 1D o de isoelectroenfoque/SDS-PAGE 2D seguido de electro-transferencia de las proteínas de los geles a nitrocelulosa. Las transferencias de nitrocelulosa se incubaron en una solución de bloqueo de leche en polvo no grasa al 2,5% disuelta en solución salina tamponada con Tris (pH 7,5), TWEEN[®]20 al 0,05%. Los sueros o plasmas caninos se diluyeron hasta el título como se ha descrito en tampón que contenía un producto lisado de *E. coli* para bloquear la unión no específica con sueros normales de ternero al 30% y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Después de lavar 3 veces en TBS-Tween[®] (0,05%), las transferencias se transfirieron a un tampón que contenía suero de ternera fetal al 50%, TBS-Tween[®]-Kathon al 50% (0,05% y 0,5%, respectivamente) para evitar la unión no específica de un producto de anticuerpo policlonal anti-Fc canino de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson Immuno Research, West Grove, PA 19390). El producto conjugado de anticuerpo policlonal anti-Fc canino de conejo se diluyó 1:5.000. Los geles se lavaron 3 veces con TBS TWEEN[®] (0,05%), una vez con TBS, y se detectó la presencia de HRP utilizando ECL Western Blotting Detección Reagents (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ 08855-1327) empleado como describe el fabricante. Las imágenes digitales de la película de rayos X expuesta fueron capturadas utilizando un GelDoc 2000 (Bio-Rad Inc.).

Ejemplo 5

Aislamiento de ADN a partir de *E. canis* y construcción de una biblioteca de expresión en lambda y escrutinio de la biblioteca de expresión en lambda de *E. canis* para los clones que tienen actividad DIVA.

La preparación y el escrutinio de las bibliotecas de expresión en lambda es un mecanismo bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, véase Current Protocols in Molecular Biology, eds. F.M. Ausubel et al., John Wiley & Sons Inc., 1997, páginas 5.1 a 5.8.6. Para la construcción de la biblioteca de expresión, el ADN genómico se purificó a partir *E. canis* aislado de cultivo celular mediante centrifugación en gradiente de PERCOLL[®] (véase más arriba). El ADN se purificó utilizando un kit de purificación de ADN genómico de Qiagen Sciences (Germantown, MD). Se utilizó un kit Vector Lambda ZAP[®]II predigerido con EcoR1/CIAP (Stratagene Corp., La Jolla, CA 92037) tal como especifica el fabricante para la construcción de la biblioteca. El ADN genómico de *E. canis* se digirió parcialmente con TSP509 y los fragmentos que oscilaban entre 2 y 6 kb se aislaron utilizando la electroforesis en gel de agarosa y se ligaron en el vector lambda. Los fagos se empaquetaron y se cultivaron como especifica el fabricante.

Se rastrearon aproximadamente 120.000 placas lambda individuales para determinar la unión a sueros aislados de perros identificados como positivos para la infección con *E. canis*, pero negativos para la reactividad con sueros de animales sensibilizados con *E. canis* desarrollado en cultivo de células (véase más arriba). En el escrutinio inicial se identificaron 84 placas individuales por tener esta actividad.

Se sometieron placas lambda a dos rondas de purificación en placa y se volvieron a someter a ensayo para verificar la reactividad positiva con sueros de animales infectados con *E. canis*, la reactividad negativa se escrutó con sueros de animales sensibilizados.

Las placas de lambda aisladas fueron escrutadas para determinar la reactividad cruzada con sueros de animales identificados como seropositivos para *Anaplasma phagocytophilia*, *Borrelia burgdorferi* (agente causante de la enfermedad de Lyme), *Rickettsia rickettsii* (agente causante de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas), *Leptospira interrogans* y *Dirofilaria immitis* (agente causante de la dirofilariosis canina).

Al final del proceso de escrutinio, se encontró que 43 placas de lambda reaccionaban con sueros de animales infectados con *E. canis* que no reaccionaron con sueros de sensibilización o sueros de perros infectados con otros patógenos caninos (véase más arriba).

Utilizando la característica ZAP[®] del vector de clonación de acuerdo con las instrucciones del fabricante, los insertos en el vector lambda se convirtieron en plásmidos. Los plásmidos se transformaron en la cepa de *E. coli* XL-1 Blue para la expresión de proteínas y el análisis de las proteínas codificadas mediante transferencia Western. Los extremos de los insertos de ADN de *E. canis* se sometieron a análisis de la secuencia de ADN utilizando cebadores de secuenciación T7 y T3.

La información de la secuencia de las reacciones tanto con T7 como con T3 de los 43 clones se presentó para el análisis BLAST en la página web NCBI. Los resultados se tabularon en formato excel. Basándose en la identidad de secuencia entre el clon y la secuencia del genoma de la pistola génica disponible para *E. canis* (NCBI: NZ-AAEJO 1000001), se identificaron los segmentos de ADN genómico de cada clon. Los clones individuales que compartían genes comunes se agruparon para su posterior análisis por medio de transferencia Western utilizando reservas de sueros caninos infectados y sensibilizados con bacterias. Basándose en patrones de bandas similares, se eliminaron los clones duplicados. Se eliminó cualquier clon que mostrara reactividad contra ambos conjuntos de sueros. Como resultado de este análisis, se seleccionaron 23 clones para una evaluación adicional. El agrupamiento de los clones y el antígeno común por grupo se muestran en la Tabla 1.

10 Tabla 1

Antígeno Común	Número de Clones
Antígeno de 120 kDa	2, 10, 17, 33, 35, 79
Proteínas de choque térmico	4, 9, 24, 66
ATPasa	7, 84
Proteína ribosomal L1	21, 47, 65
Antígeno de 200 kDa	26, 55, 76
Proteína hipotética	75
Piruvato deshidrogenasa	5
Proteína Ribosomal (50S)	6
Desconocido	57
Regulador transcripcional	82

Ejemplo 6

Análisis de transferencia de Western utilizando muestras de suero canino positivas para *E. canis* individuales

Los 23 clones fueron analizados en geles de SDS-PAGE individuales. Cada gel se transfirió a nitrocelulosa y se sometió a transferencia Western utilizando muestras individuales de suero canino de perros que sólo fueron positivos para infecciones por *E. canis* mediante el ensayo ELISA/SNAP[®]. El suero canino se diluyó 1:500 en el mismo diluyente descrito en el Ejemplo 4 que contenía producto lisado de *E. coli* y se detectó la reactividad utilizando técnicas colorimétricas con peroxidasa de rábano picante convencionales (Opti-4CN, Bio-Rad). Se evaluaron un total de trece muestras de suero canino individuales. Las transferencias se compararon a través de muestras para determinar el número de perros que mostraban reactividad con una banda predominante o conjunto de bandas por clon. Los resultados se resumen en la Tabla 2 y en la Figura 6 (los clones enumerados en negrita se representan en la figura).

Tabla 2.

Antígeno Común	Número de Clones	Reactores positivos
Antígeno de 120 KDa	2, 10, 17, 33, 35	13/13
Proteínas de choque térmico	9	12/13
ATPasa	7, 84	12/13
Proteína ribosomal L1	21, 47, 65	12/13
Antígeno de 200 kDa	26, 55, 76	12/13

Los 23 clones también fueron analizados por medio de transferencia Western utilizando suero canino reunido que había dado positivo para otras enfermedades infecciosas transmitidas por vectores. Se evaluaron las muestras que daban positivo mediante ELISA o SNAP[®] para las siguientes infecciones individuales: Dirofilariasis, enfermedad de Lyme, *Anaplasma phagocytophilum*, o *E. ewingii*. Ninguno de los clones identificados en la tabla anterior mostró reactividad cruzada con sueros caninos positivos para estas otras infecciones transmitidas por vectores.

30

Ejemplo 7

Identificación de segmentos de genes relevantes que codifican antígenos DIVA de *E. canis*.

a. Antígeno de 120 kDa

5 Este antígeno había sido descrito previamente por Yu et al. (J Clin Microbiol. 2000 Ene; 38 (I):369-74) y se había demostrado que era útil en el diagnóstico de infecciones por *E. canis* en perros. El número de acceso para este gen es AF112369 y la proteína asociada es AAD34330. Los clones 2, 10, 17 y 33 contienen segmentos completos del gen del antígeno de 120 kDa. El clon 35 puede contener un truncamiento de este gen. (Véanse los SEQ ID NO: 1 y 2).

10 Este gen se amplificó a partir ADN genómico de *E. canis* y se subclonó en un sistema de expresión pET con una etiqueta 6-His de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de la secuenciación de este plásmido coincidían exactamente con la secuencia del gen que codifica la proteína mostrada en el SEQ ID NO: 2, a partir de los aminoácidos 58 a 589. Los productos lisados de proteína de bacterias BL21 en las que se había inducido la expresión de esta proteína se analizaron por transferencia Western con sueros caninos infectados y se compararon con transferencias Western sondeadas con sueros de animales sensibilizados con organismos adaptados al cultivo. En consonancia con los resultados anteriores, solamente los sueros de perros infectados reconocieron esta proteína de peso molecular esperado (datos no mostrados).

15 P120 tiene un motivo de 36 aminoácidos que se repite 14 veces. Véase la Figura 8, SEQ ID NO: 15. La porción repetida (región subrayada en la Figura_8) es un péptido de 60 kD. La Figura 9A muestra las 14 repeticiones alineadas (SEQ ID NO: 16). La Figura 9B muestra la secuencia consenso de las 14 repeticiones (SEQ ID NO: 17).
20 Una realización de la invención proporciona un polipéptido que comprende:

KEEX₁TPEVX₂AEDLQPAVDX₃SX₄EHSSEVGX₅KVXS₆TS (SEQ ID NO: 17).

Donde

X₁ = S ó N

X₂ = K ó R

25 X₃ = G, D ó S

X₄ = V ó I

X₅ = E ó K

X₆ = E ó K

30 Otra realización de la invención proporciona un polipéptido multimérico donde el SEQ ID NO: 17 se repite dos o más veces. El polipéptido multimérico puede comprender también uno o más polipéptidos heterólogos.

b. Antígeno de 200 kDa

35 Este antígeno había sido descrito previamente por McBride et al. (J Clin Microbiol. 2001 Ene; 39(I): 315-22) y se ha demostrado que es útil en el diagnóstico de la ehrlichiosis. El número de acceso para este gen es AF252298 y la proteína asociada AAK01145. Una porción de esta secuencia de la proteína se asocia con una patente publicada (SEQ ID NO: 2 de la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.355.777, número de acceso AAE96254). Los autores de la presente invención han identificado una región diferente de esta proteína que sirve como antígeno de diagnóstico para la ehrlichiosis y un reactivo DIVA. La porción del gen abarca desde el nucleótido 1081 de AF252298 hasta el final, nucleótido 4266. (Véanse los SEQ ID NO: 3 y 4).

40 Este gen se amplificó a partir de ADN genómico de *E. canis* y se subclonó en un sistema de expresión pET con una etiqueta 6-His de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de la secuenciación de este plásmido coincidían exactamente con la secuencia del gen que codificaba la proteína mostrada en el SEQ ID NO: 4, a partir de los aminoácidos 1 a 1061. Se analizaron los productos lisados proteicos de bacterias BL21 en las que se había inducido la expresión de esta proteína por medio de transferencia Western con sueros caninos infectados y se compararon con transferencias Western sondeadas con sueros de animales sensibilizados con organismos adaptados al cultivo. En consonancia con los resultados anteriores, solamente los sueros de perros infectados reconocían esta proteína de peso molecular esperado (datos no mostrados).

c. ATPasa

50 Este gen (etiqueta Locus "Ecan02000699") ha sido pronosticado por análisis computacional automatizado de la secuencia del genoma de la pistola génica de *E. canis*. Codifica una proteína de más de 4000 aminoácidos (ZP_00210575). El escrutinio DIVA de *E. canis* identificó dos regiones separadas de este gen y su proteína asociada

como posibles antígenos inmunodominantes y reactivos DIVA. Los segmentos de la proteína identificada en los clones 84 y 7 son los aminoácidos 1984-2774 y 2980-3740, respectivamente, del número de acceso 46308382. (Véanse los SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8).

5 Ambos fragmentos de este gen se amplificaron a partir de ADN genómico de *E. canis* y se subclonaron por separado en un sistema de expresión pET con una etiqueta 6-His de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de la secuenciación de este plásmido coinciden exactamente con las secuencias de genes asociados con las proteínas mostradas en los SEQ ID NO: 6 y 8, a partir de los aminoácidos 1 a 782 y 1 a 746 respectivamente. Los productos lisados de proteína de bacterias BL21 en las que se había inducido la expresión de estas proteínas se analizaron por transferencia Western con sueros caninos infectados y se compararon con transferencias Western sondeadas con sueros de animales sensibilizados con organismos adaptados al cultivo. En 10 consonancia con los resultados anteriores, solamente los sueros de perros infectados reconocieron estas proteínas de peso molecular esperado (datos no mostrados).

d. Proteínas de choque térmico

15 Aunque este clon contenía un gen para la proteína de choque térmico, GrpE, la secuencia génica que codifica el antígeno inmunodominante surge de una secuencia de proteína hipotética pronosticada por el análisis computacional automatizado del genoma. Basándose en el peso molecular y el pI de la proteína, el gen de interés en el clon 9 es el número de locus "Ecan02000495" y la proteína asociada 46308954.

20 Debido a que esta proteína solamente es pronosticada a partir de la anotación informática del genoma y no ha sido identificada previamente a partir de organismos de *E. canis* como una proteína inmunodominante, esta es la primera evidencia de que este gen se expresa en *E. canis* y estimula una respuesta inmunitaria en el anfitrión canino infectado. La proteína se identificará como antígeno PI6 (véanse los SEQ ID NO: 9 y 10).

25 Este gen se amplificó a partir del vector pBluescript que contenía el ADN genómico de interés y se subclonó en un sistema de expresión pET con una etiqueta 6-His de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de la secuenciación de este plásmido coincidían exactamente con la secuencia del gen asociado con el número locus "Ecan02000495". Los productos lisados de proteína de bacterias BL21 en las que se había inducido la expresión de esta proteína se analizaron por transferencia Western con sueros caninos infectados y se compararon con transferencias Western sondeadas con sueros de animales sensibilizados con organismos adaptados al cultivo. En consonancia con los resultados anteriores, solamente los sueros de perros infectados reconocieron esta proteína de peso molecular esperado (véase la Figura 7).

30 e. Proteína ribosomal L1

35 Este gen es identificado por la etiqueta de locus "Ecan02000476" del genoma de *E. canis*. La proteína asociada tiene el número de acceso ZP_00211130 (véanse los SEQ ID NO: 11 y 12). La identificación de esta proteína se ha pronosticado basándose en el análisis computacional automatizado del genoma. Un análisis BLAST de esta proteína revela que la secuencia es idéntica aproximadamente en 70% a una proteína de la superficie de *E. chaffeensis* (Número de acceso 4894576). La inmunoreactividad con la proteína de *E. chaffeensis* ha sido previamente referida por Yu et al., (J Clin Microbiol. 1999 Agosto; 37(8): 2568-75). La proteína de *E. chaffeensis* (Número de acceso 4894576) se conoce como proteína precursora de 106 kDa.

f. Posibles antígenos No de 120 kDa

40 Dentro del fragmento genómico que contiene el gen para el antígeno de 120 kDa, están presentes otros genes que también pueden ser reactivos inmunodominantes y DIVA. Por ejemplo, el clon 10 produce un patrón de bandas diferente en transferencias Western sondeadas con sueros infectados, en comparación con los clones que contienen el antígeno de 120 kDa solo. El clon 10 contiene la información genética para los componentes VirD4 de una ruta secretora de Tipo IV y esta secuencia génica es identificada por la etiqueta de locus "Ecan02000624". Este gen codifica una proteína de 723 aminoácidos (ZP_00211244), pero sólo aparece una porción de esta proteína que es 45 expresada por el clon 10, según lo determinado por el peso molecular de la proteína identificada en el gel (véanse los SEQ ID NO: 13 y 14)

REIVINDICACIONES

1. Un método para distinguir entre un animal que ha sido infectado con *Ehrlichia canis* y un animal que no ha sido infectado con *E. canis*, comprendiendo el método:
- 5 (a) poner en contacto una muestra biológica de un animal con uno o más polipéptidos purificados que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 10; y
- (b) detectar si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente a los uno o más polipéptidos purificados;
- en donde si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente a los uno o más polipéptidos purificados, en ese caso el animal ha sido infectado con *E. canis*.
2. El método de la reivindicación 1, en donde los uno o más polipéptidos purificados están anclados a un soporte sólido.
3. El método de la reivindicación 1, en donde los uno o más polipéptidos purificados están en una forma multimérica.
4. El método de la reivindicación 1, en donde los uno o más polipéptidos purificados están conectados a una proteína heteróloga, un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un conector de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de parada de la transferencia, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas, o una combinación de los mismos.
- 15 5. El método de la reivindicación 1, en donde el animal ha sido vacunado contra *E. canis*.
6. Un método para determinar la presencia o ausencia de un anticuerpo o fragmento del mismo, en una muestra de ensayo, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se unen específicamente a uno o más polipéptidos purificados que consisten en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 10, comprendiendo el método:
- 20 (a) poner en contacto la muestra de ensayo con uno o más polipéptidos purificados que consisten en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 10 en condiciones adecuadas para la unión específica de los uno o más polipéptidos purificados al anticuerpo o fragmento del mismo; y
- (b) detectar la presencia o ausencia de unión específica;
- 25 en donde la presencia de unión específica indica la presencia del anticuerpo o fragmento del mismo, y en donde la ausencia de unión específica indica la ausencia del anticuerpo o fragmento del mismo.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el método comprende adicionalmente detectar la cantidad de unión específica.
8. El método de la reivindicación 6, en donde los uno o más polipéptidos purificados que consisten en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 10 se inmovilizan en un soporte sólido.
- 30 9. El método de la reivindicación 6, en donde los uno o más polipéptidos purificados que consisten en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 10 se encuentran en una forma multimérica.
10. El método de la reivindicación 6, en donde los uno o más polipéptidos purificados que consisten en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 10 están conectados a una proteína heteróloga, un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un conector de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de parada de la transferencia, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas, o una combinación de los mismos.
- 35 11. Una composición que comprende uno o más polipéptidos purificados que consisten en una secuencia de aminoácidos como se expone en el SEQ ID NO: 10.
- 40 12. La composición de la reivindicación 11, en donde los uno o más polipéptidos purificados están en una forma multimérica.
13. La composición de la reivindicación 11, en donde los uno o más polipéptidos purificados están conectados a una proteína heteróloga, un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un conector de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de parada de la transferencia, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas, o una combinación de los mismos.
- 45

FIG. 2

ANÁLISIS GEL 2D DE *E. canis*
AISLADO - TEÑIDO CON AZUL
DE COOMASIE BIOSAFE

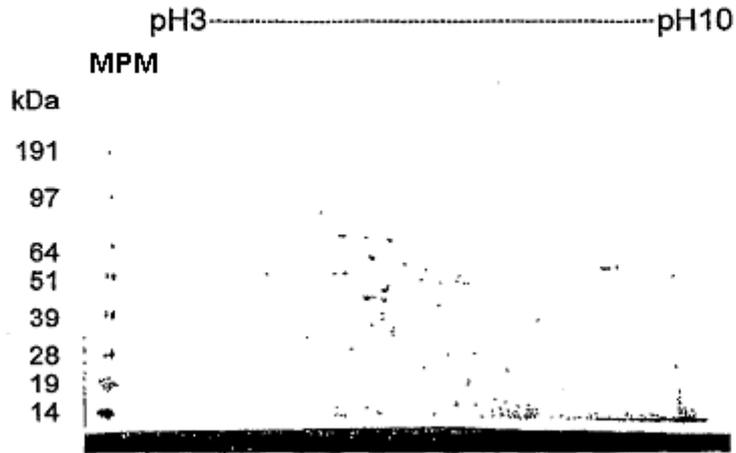


FIG. 3

TRANSFERENCIA WESTERN DE PROTEÍNAS DE *E. canis* RESUELTAS
UTILIZANDO GELES 2D SONDEADOS CON PLASMA CANINO NORMAL

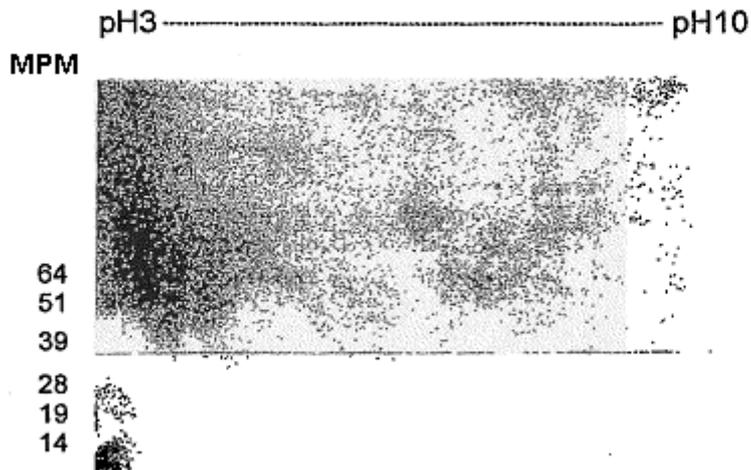


FIG. 4

ANÁLISIS WESTERN CON RESERVA DE SUEROS VACUNADOS DE 4 PERROS VACUNADOS - 1:100

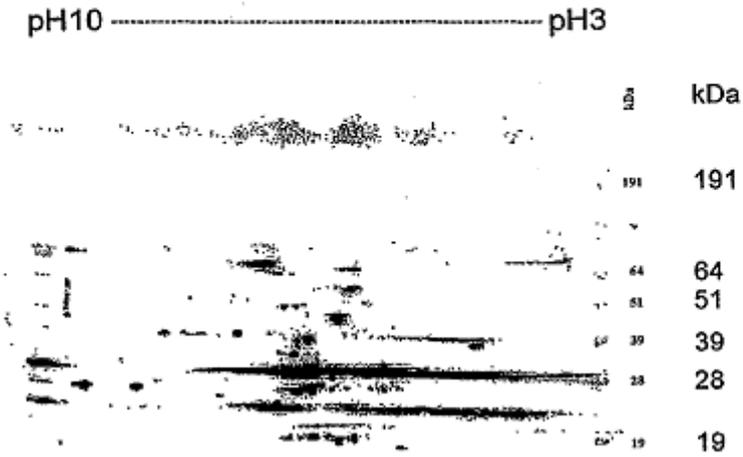


FIG. 5

ANÁLISIS WESTERN CON RESERVA DE SUEROS INFECTADOS DE 3 PERROS POSITIVOS - 1:100

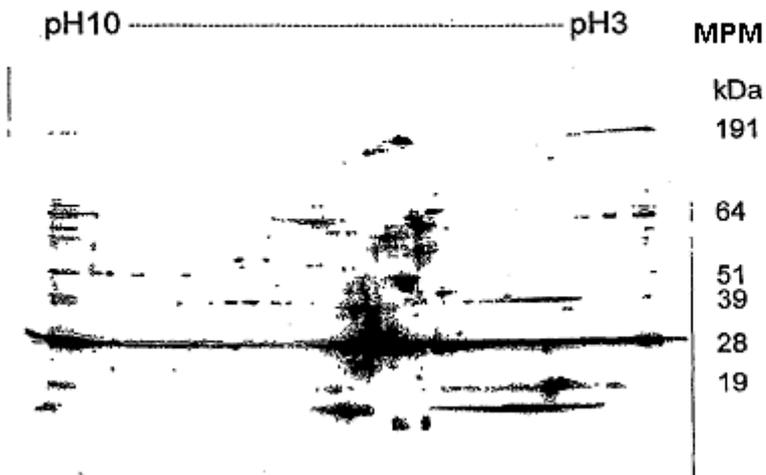


FIG. 6

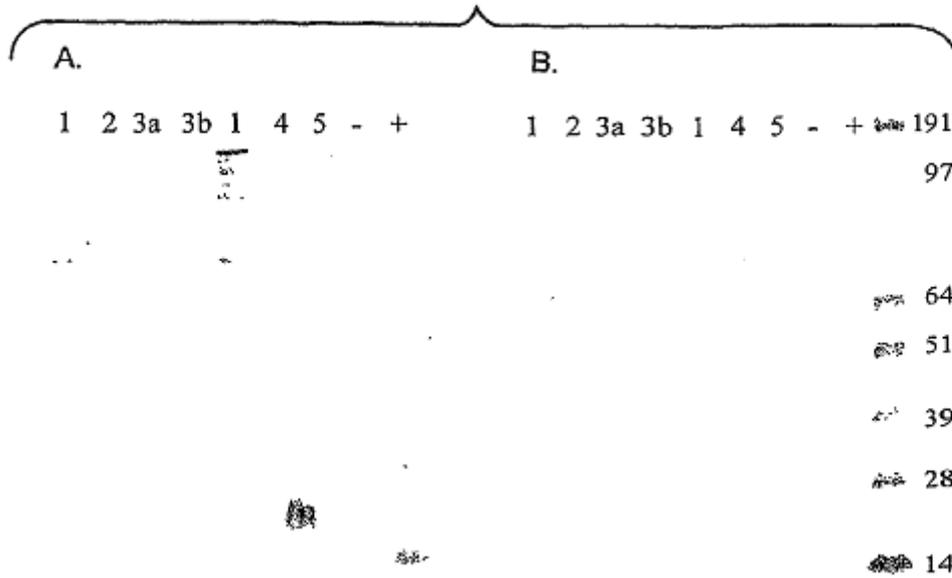


FIG. 7

