

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 952**

51 Int. Cl.:

C07K 14/195 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2010 PCT/US2010/057430**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2011 WO11063235**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2010 E 10832262 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2501718**

54 Título: **Péptidos, dispositivos y procedimientos para la detección de anticuerpos de Ehrlichia**

30 Prioridad:

20.11.2009 US 263329 P

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

13.01.2017

73 Titular/es:

**ABAXIS, INC. (100.0%)
3240 Whipple Road
Union City, CA 94587-1217, US**

72 Inventor/es:

**MEHRA, RAJESH K.;
ARON, KENNETH P. y
BLEILE, DENNIS M.**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 596 952 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

Péptidos, dispositivos y procedimientos para la detección de anticuerpos de Ehrlichia

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. nº. 61/263.329, presentada el 20 de noviembre de 2009.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las bacterias *Ehrlichia* son patógenos intracelulares obligados que infectan los linfocitos en circulación en hospedadores mamíferos. *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* son miembros del mismo grupo subgenérico que infecta a caninos y humanos y causa la ehrliquiosis monocítica canina (EMC) y la ehrliquiosis monocítica humana (EMH), respectivamente. La enfermedad canina está caracterizada por fiebre, linfadenopatía, pérdida de peso y pancitopenia. En seres humanos, la enfermedad se caracteriza por fiebre, cefalea, mialgia y leucopenia. La detección y tratamiento tempranos son importantes para tratar tanto la ehrliquiosis canina como humana.

Se han usado típicamente en el diagnóstico de estas enfermedades ensayos de inmunofluorescencia indirectos (IFA) y ensayos de inmunosorción ligada a enzima (ELISA). Estos ensayos miden o detectan de otro modo la unión de anticuerpos anti-*Ehrlichia* de la sangre, plasma o suero de un sujeto a células infectadas, lisados celulares o proteínas de *Ehrlichia* enteras parcialmente purificadas. Sin embargo, los ensayos actualmente conocidos para detectar anticuerpos anti-*Ehrlichia* o fragmentos de los mismos están fuertemente limitados en su utilidad debido a problemas de sensibilidad y especificidad relacionados directamente con la naturaleza impura del antígeno o antígenos de *Ehrlichia* usados en estos ensayos. Es decir, los ensayos actualmente conocidos usan mezclas de muchos antígenos enteros de *Ehrlichia* o antígenos que no son específicos de especie.

El documento WO 2008/137881 describe el agrupamiento génico *omp-1* que codifica 21 proteínas de *Ehrlichia ewingii* (EE) y describe también polipéptidos de *E. ewingii* (EE) aislados, polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos, sondas, cebadores, anticuerpos aislados de EE y procedimientos para su producción, composiciones inmunogénicas y vacunas, así como procedimientos de uso de polipéptidos, anticuerpos, sondas y cebadores de EE con fines de diagnóstico, terapia y producción de vacunas contra *E. ewingii*.

Zhang et al. (2008) describe la familia del gen *omp-1* de *E. ewingii* y analiza en los péptidos sintetizados OMP-1 la antigenicidad. Se encontró que los plasmas de perros infectados experimentalmente con *E. ewingii* reaccionan significativamente con la mayoría de péptidos específicos de OMP-1, indicando que se expresaban múltiples OMP-1 y eran inmunogénicas en los perros infectados. Zhang et al. reseña que sus resultados apoyan la utilidad de los péptidos de OMP-1 personalizados como antígenos de prueba serológica de *E. ewingii*. Clinical and Vaccine Immunology, marzo de 2008. 402-411, vol. 15, nº 3.

El documento US2002/0120115 proporciona herramientas de diagnóstico para serodiagnosticar ehrliquiosis en mamíferos, particularmente en miembros de la familia *Canidae* y en seres humanos. Las herramientas de diagnóstico son un grupo de proteínas de membrana externa de *E. chaffeensis* y variantes de las mismas (las "proteínas OMP"), un grupo de proteínas de membrana externa de *E. canis* y variantes (las proteínas "P30F") y anticuerpos contra las proteínas OMP y las proteínas P30F. Se proporcionan también polinucleótidos aislados que codifican las proteínas OMP de *E. chaffeensis* y polinucleótidos aislados que codifican la proteína P30F de *E. canis*. El documento US2002/0120115 se refiere también a kits que contienen reactivos para diagnosticar ehrliquiosis humana y ehrliquiosis canina, y a composiciones inmunogénicas que contienen una o más proteínas OMP o proteínas P30F.

El documento US2002/0132789 describe vacunas de ácido nucleico que contienen genes para proteger a animales y seres humanos frente a enfermedades de *Rickettsia*. Se describen también polipéptidos y procedimientos de uso de estos polipéptidos para detectar anticuerpos contra patógenos.

El documento US2002/0177178 describe procedimientos y composiciones para la detección de anticuerpos de *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* y fragmentos de anticuerpo.

Por consiguiente, permanece la necesidad en la materia de ensayos adicionales para detectar antígenos de *Ehrlichia* y serodiagnosticar ehrliquiosis monocítica.

60 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención está basada, en parte, en el descubrimiento de que ciertas variantes de secuencia en un fragmento de proteínas de la proteína de membrana externa 1 (OMP-1) de *Ehrlichia* proporcionan una detección robusta de una respuesta de anticuerpo contra una serie de especies de *Ehrlichia*. Por consiguiente, se proporcionan en la presente memoria composiciones, dispositivos, procedimientos y kits útiles para la detección de anticuerpos

que se unen a antígenos de *Ehrlichia* y el diagnóstico de ehrliquiosis monocítica.

En un aspecto, la invención proporciona péptidos capaces de unirse a anticuerpos que reconocen antígenos de *Ehrlichia*, como se precisa en las reivindicaciones. Se divulgan también en la presente memoria péptidos que comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1, X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-T-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-G-L-K-Q-X₁₈-W-X₂₀-G-X₂₂-X₂₃-X₂₄-X₂₅-X₂₆-X₂₇-X₂₈-X₂₉-X₃₀-X₃₁-X₃₂-X₃₃-X₃₄-X₃₅-X₃₆-X₃₇-X₃₈-X₃₉-X₄₀ (SEQ ID NO: 1) donde cada uno de X₁-X₆ y X₂₇-X₄₀ es cualquier aminoácido, X₇ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en N y Q, X₈ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en T y P, X₁₀ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en T y V, X₁₁ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en G y A, X₁₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en L y V, X₁₃ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en Y y F, X₁₈ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en D y N, X₂₀ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en D y N, X₂₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en S y V, X₂₃ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en A, S y T, X₂₄ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en A e I, X₂₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en S, T y P y X₂₆ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en S, N y K.

Se divulgan también en la presente memoria péptidos que comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₇ es Q y X₂₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en T y P. En ciertas realizaciones, los péptidos de la invención comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₇ es N y X₂₅ es S. En ciertas realizaciones, los péptidos de la invención comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₁ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en S y K, X₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en A, V y R, X₃ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y D, X₄ es E, X₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E, D y N y X₆ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y Q. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₁ es S, X₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en A y V, X₃ es K, X₄ es E, X₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y D y X₆ es K. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₁-X₆ tienen la secuencia K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO: 2). En ciertas realizaciones, X₂₇-X₄₀ tienen una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 3), M-A-P-F-H-E-L-D-V-N-N-H-P-N (SEQ ID NO: 4), S-L-N-V-S-F-L-I-D-P-M-A-P-F (SEQ ID NO: 5) y Q-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q (SEQ ID NO: 6).

La invención comprende una mezcla de péptidos aislados que comprenden tres o más péptidos aislados diferentes, donde cada péptido aislado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 59: F-S-A-K-X₅-X₆-X₇-A-E-T-X₁₁-X₁₂-T-F-G-X₁₆-X₁₇-X₁₈-X₁₉-X₂₀-D-G-A-X₂₄-X₂₅-X₂₆-X₂₇-N-X₂₉-V-X₃₁-N-X₃₃-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 59) donde X₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q, X₆ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q, X₇ es cualquier aminoácido, X₁₁ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y R, X₁₂ es cualquier aminoácido, X₁₆ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en L e I, X₁₇ es cualquier aminoácido, X₁₈ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en R y K, X₁₉ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en Q y N, X₂₀ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en Y y T, X₂₄ es cualquier aminoácido, X₂₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en I y L, X₂₆ es cualquier aminoácido, X₂₇ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en D y E, X₂₉ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q, X₃₁ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q y X₃₃ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y R, y donde cualquier secuencia peptídica N-terminal o C-terminal adicional de la secuencia de SEQ ID NO: 59 es una secuencia no nativa.

En ciertas realizaciones, los péptidos de la invención comprenden o consisten en una secuencia de SEQ ID NO: 59 donde X₅ es E, X₆ es E, X₁₆ es L, X₁₈ es K, X₂₀ es Y, X₂₅ es I, X₂₉ es Q, X₃₁ es Q y X₃₃ es K. En otras realizaciones, los péptidos de la invención comprenden o consisten en una secuencia de SEQ ID NO: 59 donde X₇ es K, X₁₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y R, X₁₇ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y D, X₂₄ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y Q y X₂₆ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y T, como se precisa en las reivindicaciones.

Se divulgan también en la presente memoria péptidos que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 92, G-X₂-F-S-A-K-X₇-X₈-K-X₁₀-A-D-T-R-X₁₅-T-F-G-L-X₂₀-K-Q-T-D-G-A-X₂₇-I-X₂₉-E-N-X₃₂-V-X₃₄-N-X₃₆-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 92) donde X₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en D y N, X₇ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q, X₈ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q, X₁₀ es cualquier aminoácido, X₁₅ es cualquier aminoácido, X₂₀ es cualquier aminoácido, X₂₇ es cualquier aminoácido, X₂₉ es cualquier aminoácido, X₃₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q, X₃₄ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q y X₃₆ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y R. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden o consisten en una secuencia de SEQ ID NO: 92 donde X₂ es N, X₇ es E, X₈ es E, X₃₂ es Q, X₃₄ es Q y X₃₆ es K.

Se divulgan también en la presente memoria péptidos que comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 92 y que comprenden además una secuencia peptídica N-terminal adicional. La secuencia peptídica N-terminal adicional puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos y puede ser una

secuencia nativa o no nativa. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden una secuencia definida por la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 92 y que comprende además una secuencia C-terminal adicional. La secuencia peptídica C-terminal adicional puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos y puede ser una secuencia nativa o no nativa. En ciertas realizaciones, la secuencia no nativa comprende un antígeno de *Ehrlichia* no de OMP-1 (p.ej., p38, p43, p120, p140, p153, p156, p200, gp19, gp36, gp47, gp200 o HGE-3 de *Ehrlichia*).

En ciertas realizaciones, los péptidos de la invención comprenden al menos 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos. Los péptidos de la invención son péptidos aislados (p.ej., sintéticos y/o purificados). En ciertas realizaciones, los péptidos de la invención se conjugan con un ligando. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los péptidos se biotinilan. En otras realizaciones, los péptidos se conjugan con estreptavidina, avidina o neutravidina. En otras realizaciones, los péptidos se conjugan con una proteína vehículo (p.ej. seroalbúmina o un dominio Fc de inmunoglobulina). En aún otras realizaciones, los péptidos se conjugan con un dendrímero y/o son parte de un sistema de péptidos antigénicos múltiples (MAPS).

En ciertas realizaciones, los péptidos de la invención se enlazan con o se inmovilizan sobre un soporte sólido. En ciertas realizaciones, el soporte sólido es una perla (p.ej., una partícula coloidal, nanopartícula, perla de látex, etc.), una ruta de flujo en un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral (p.ej., una membrana porosa), una ruta de flujo en un rotor analítico o un tubo o pocillo (p.ej., en una placa adecuada para ensayo ELISA).

Se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden dos o más péptidos de la divulgación. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la composición comprende una mezcla de 2, 3, 4 o más péptidos diferentes de la divulgación, donde cada péptido comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la composición comprende una mezcla de 2, 3, 4 o más péptidos diferentes de la divulgación, donde cada péptido comprende una secuencia de SEQ ID NO: 59. En otras realizaciones, la composición comprende una mezcla de 2, 3, 4 o más péptidos diferentes de la divulgación, donde cada péptido comprende una secuencia de SEQ ID NO: 92.

En ciertas realizaciones, los péptidos se conjugan con un ligando. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los péptidos se biotinilan. En otras realizaciones, los péptidos se conjugan con estreptavidina, avidina o neutravidina. En otras realizaciones, los péptidos se conjugan con una proteína vehículo (p.ej., seroalbúmina o un dominio Fc de inmunoglobulina). En aún otras realizaciones, los péptidos se conjugan con un dendrímero y/o son parte de un sistema de péptidos antigénicos múltiples (MAPS).

Se proporcionan también en la presente memoria ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica un péptido de la divulgación. Además, la divulgación proporciona vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos y células hospedadoras que comprenden dichos vectores. En ciertas realizaciones, el vector es un vector lanzadera. En otras realizaciones, el vector es un vector de expresión (p.ej., un vector de expresión bacteriana o eucariótica). En ciertas realizaciones, la célula hospedadora es una célula bacteriana. En otras realizaciones, la célula hospedadora es una célula eucariótica.

Se divulgan también en la presente memoria dispositivos. En ciertas realizaciones, los dispositivos son útiles para efectuar un inmunoensayo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones el dispositivo es un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral. En otras realizaciones, el dispositivo es un rotor analítico. En otras realizaciones, el dispositivo es un tubo o un pocillo, p.ej. en una placa adecuada para un ensayo ELISA. En aún otras realizaciones, el dispositivo es un sensor electroquímico, óptico u optoelectrónico.

En ciertas realizaciones, el dispositivo comprende un péptido de la invención. En otras realizaciones, el dispositivo comprende una mezcla de péptidos diferentes de la invención. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el dispositivo comprende 2, 3, 4 o más péptidos diferentes de la invención. En ciertas realizaciones, el péptido o cada péptido de la mezcla comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 92. En ciertas realizaciones, los péptidos están enlazados con o inmovilizados sobre el dispositivo.

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos de detección en una muestra de un anticuerpo contra un epítipo de un antígeno de *Ehrlichia* como se precisa en las reivindicaciones. Los procedimientos comprenden poner en contacto una muestra con una mezcla de péptidos aislados de la invención y detectar la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende uno o más de dichos péptidos aislados de la mezcla, donde la formación de dicho complejo es indicativa de la presencia de un anticuerpo contra un epítipo de un antígeno de *Ehrlichia* en dicha muestra. En ciertas realizaciones, el antígeno de *Ehrlichia* es de una especie de *Ehrlichia* infecciosa, tal como *Ehrlichia canis* o *Ehrlichia chaffeensis*. Los procedimientos comprenden poner en contacto la muestra con una mezcla de 3, 4 o más péptidos diferentes de la invención.

Cada péptido de la mezcla es un péptido aislado (p.ej., sintético y/o purificado). En ciertas realizaciones, la mezcla de péptidos se enlaza con o inmoviliza sobre un soporte sólido. En ciertas realizaciones, el soporte sólido es una perla (p.ej., una partícula coloidal, una nanopartícula, una perla de látex, etc.), una ruta de flujo en un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral (p.ej. una membrana porosa), una ruta de flujo en un rotor analítico o un tubo o pocillo (p.ej., en una placa adecuada para un ensayo ELISA). En ciertas realizaciones, el soporte sólido comprende metal,

vidrio, un material basado en celulosa (p.ej. nitrocelulosa) o un polímero (p.ej., poliestireno, polietileno, polipropileno, poliéster, nailon, polisulfona, etc.). En ciertas realizaciones, el péptido o mezcla de diferentes péptidos se enlaza con un dendrímero y/o se incorpora a un sistema MAPS.

5 En ciertas realizaciones, la etapa de detección comprende efectuar un ensayo ELISA. En otras realizaciones, la etapa de detección comprende efectuar un inmunoensayo de flujo lateral. En otras realizaciones, la etapa de detección comprende efectuar un ensayo de aglutinación. En otras realizaciones, la etapa de detección comprende centrifugar la muestra en un rotor analítico. En aún otras realizaciones, la etapa de detección comprende analizar la muestra con un sensor electroquímico, un sensor óptico o un sensor optoelectrónico.

10 En ciertas realizaciones, la muestra es un fluido corporal tal como sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, moco o saliva. En otras realizaciones, la muestra es un tejido (p.ej. un homogeneizado de tejido) o un lisado celular. En ciertas realizaciones, la muestra es de un animal silvestre (p.ej., un venado o roedor tal como ratón, ardilla rayada, ardilla, etc.). En otras realizaciones, la muestra es de un animal de laboratorio (p.ej. un ratón, rata, conejillo de Indias, conejo, mono, primate, etc.). En otras realizaciones, la muestra es de un animal domesticado o salvaje (p.ej. un perro, gato o caballo). En aún otras realizaciones, la muestra es de un ser humano.

15 En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos de diagnóstico de ehrliquiosis monocítica en un sujeto como se precisa en las reivindicaciones. Los procedimientos comprenden poner en contacto una muestra del sujeto con una mezcla de péptidos aislados de la invención, y detectar la formación de un complejo de anticuerpo-péptido que comprenda dicho péptido, donde la formación de dicho complejo es indicativa de que el sujeto tiene ehrliquiosis monocítica. Los procedimientos comprenden poner en contacto la muestra con una mezcla de 3, 4 o más péptidos diferentes de la invención.

20 Cada péptido de la mezcla es un péptido aislado (p.ej. sintético y/o purificado). En ciertas realizaciones, la mezcla de péptidos diferentes se enlaza con o inmoviliza sobre un soporte sólido. En ciertas realizaciones, el soporte sólido es una perla (p.ej. una partícula coloidal, una nanopartícula, una perla de látex, etc.), una ruta de flujo en un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral (p.ej. una membrana porosa), una ruta de flujo en un rotor analítico o un tubo o pocillo (p.ej. en una placa adecuada para ensayo ELISA). En ciertas realizaciones, el soporte sólido comprende metal, vidrio, un material basado en celulosa (p.ej. nitrocelulosa) o un polímero (p.ej. poliestireno, polietileno, polipropileno, poliéster, nailon, polisulfona, etc.). En ciertas realizaciones, el péptido o mezcla de péptidos diferentes se enlaza con un dendrímero y/o se incorpora a un sistema MAPS.

25 En ciertas realizaciones, la etapa de detección comprende efectuar un ensayo ELISA. En otras realizaciones, la etapa de detección comprende efectuar un inmunoensayo de flujo lateral. En otras realizaciones, la etapa de detección comprende efectuar un ensayo de aglutinación. En otras realizaciones, la etapa de detección comprende centrifugar la muestra en un rotor analítico. En aún otras realizaciones, la etapa de detección comprende analizar la muestra con un sensor electroquímico, un sensor óptico o un sensor optoelectrónico.

30 En ciertas realizaciones, la muestra es un fluido corporal tal como sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina o saliva. En otras realizaciones, la muestra es un tejido (p.ej. un homogeneizado de tejido) o un lisado celular. En ciertas realizaciones, la muestra es de un animal silvestre (p.ej., un venado o roedor tal como ratón, ardilla rayada, ardilla, etc.). En otras realizaciones, el sujeto es un animal de laboratorio (p.ej. un ratón, rata, conejillo de Indias, conejo, mono, primate, etc.). En otras realizaciones, el sujeto es un animal domesticado o salvaje (p.ej. un perro, gato o caballo). En aún otras realizaciones, el sujeto es un ser humano.

35 En aún otro aspecto, la invención proporciona kits como se precisa en las reivindicaciones. Los kits comprenden 3, 4 o más péptidos aislados diferentes de la invención. Los péptidos pueden comprender una secuencia de SEQ ID NO: 59. En ciertas realizaciones, los péptidos se enlazan con o se inmovilizan sobre un soporte sólido. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el soporte sólido es una perla (p.ej. una partícula coloidal, nanopartícula, perla de látex, etc.), una ruta de flujo en un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral, una ruta de flujo en un rotor analítico o un tubo o pocillo (p.ej. en una placa). En ciertas realizaciones, el péptido o péptidos se enlazan con un dendrímero y/o se incorporan a un sistema MAPS.

40 En ciertas realizaciones, los kits comprenden además una población de perlas o una placa (p.ej. una placa adecuada para un ensayo ELISA). Los kits divulgados en la presente memoria pueden comprender además un dispositivo tal como un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral, un rotor analítico, un sensor electroquímico, un sensor óptico o un sensor optoelectrónico. En ciertas realizaciones, la población de perlas, la placa o el dispositivo son útiles para efectuar un inmunoensayo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la población de perlas, la placa o el dispositivo son útiles para detectar la formación de un complejo de anticuerpo-péptido que comprende un anticuerpo de una muestra y un péptido de la invención. En ciertas realizaciones, un péptido o mezcla de péptidos diferentes de la invención se enlaza con o se inmoviliza sobre las perlas, la placa o el dispositivo.

45 Los kits pueden comprender además instrucciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los kits comprenden instrucciones que indican cómo usar un péptido de la invención para detectar un anticuerpo contra un antígeno de *Ehrlichia* o para diagnosticar ehrliquiosis monocítica. En ciertas realizaciones, los kits comprenden instrucciones que

indican cómo usar una población de perlas, una placa o un dispositivo (p.ej., que comprende un péptido o una mezcla de péptidos diferentes de la invención) para detectar un anticuerpo contra un antígeno de *Ehrlichia* o para diagnosticar ehrlichiosis monocítica.

- 5 Resultarán evidentes aspectos y realizaciones adicionales de la invención a partir de la descripción detallada siguiente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 La **Figura 1** es un diagrama de un ensayo de tipo sándwich indirecto que puede usarse para detectar anticuerpos contra antígenos de *Ehrlichia*. En esta realización, se inmovilizan anticuerpos anti-IgG/IgM humana o anti-IgG/IgM de perro sobre un sustrato adecuado (p.ej., membrana de nitrocelulosa) en un sitio de prueba. Los anticuerpos de la muestra de prueba se unen a los anticuerpos inmovilizados. Se unirán entonces los anticuerpos de muestra de prueba contra antígenos de *Ehrlichia* apropiados a los péptidos de la invención. Cuando los péptidos de la invención se conjugan con biotina, puede usarse estreptavidina marcada con oro coloidal para detectar la presencia de los péptidos en el sitio de prueba. Puede apreciarse que el ensayo de tipo sándwich indirecto puede funcionar a la inversa, es decir, los péptidos de la invención pueden inmovilizarse sobre un sustrato para capturar los anticuerpos anti-*Ehrlichia* en una muestra de prueba, y pueden usarse anticuerpos anti-IgG/IgM humana o anti-IgG/IgM de perro conjugados con un marcaje (p.ej. oro coloidal) para detectar la presencia de los anticuerpos unidos a los péptidos inmovilizados sobre el sitio de prueba.

La **Figura 2** es un diagrama de un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral basado en el ensayo de tipo sándwich indirecto de la Fig. 1. En esta realización de un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral, se aplica la muestra a una almohadilla de carga de muestra y después se hace circular a través de la almohadilla de conjugado hasta la membrana de prueba. Los complejos de péptido-biotina-estreptavidina-oro se solubilizan a medida que la muestra pasa a través de la almohadilla de conjugado y se forman entonces los complejos entre péptidos de la invención y anticuerpos anti-antígeno de *Ehrlichia* apropiados. El sitio de prueba comprende anticuerpos anti-IgG o anti-IgM apropiados de muestra que se unen a todos los anticuerpos en la muestra. Puede usarse proteína L, por ejemplo, en lugar de los anticuerpos anti-IgG o anti-IgM. Si se han unido suficientes anticuerpos de la muestra a los péptidos de la invención, aparecerá una señal positiva en el sitio de prueba. En otra realización de un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral, se inmovilizan los péptidos de la invención sobre el sitio de prueba (T) y están presentes en la almohadilla de conjugado anticuerpos anti-IgG o anti-IgM apropiados de muestra (p.ej., antihumanos o anticánicos) conjugados con un marcaje detectable (p.ej. partículas de oro coloidal). El paso de la muestra a través de la almohadilla de conjugado solubiliza los anticuerpos marcados, y cualquier anticuerpo anti-antígeno de *Ehrlichia* presente en la muestra de prueba se une a los anticuerpos marcados y dichos complejos de anticuerpo se capturan por los péptidos de *Ehrlichia* inmovilizados en el sitio de prueba, produciendo así una señal positiva. En cualquier realización, el dispositivo puede comprender además un sitio de control (C) en el que se inmovilizan los ligandos de unión que reconocen el péptido marcado o anticuerpo marcado en la almohadilla de conjugado.

40 La **Figura 3** es un diagrama de un ensayo de tipo sándwich de doble antígeno que puede usarse para detectar anticuerpos contra antígenos de *Ehrlichia*. En esta realización, se inmovilizan los péptidos de la invención sobre un sustrato adecuado (p.ej., membrana de nitrocelulosa, pocillo de placa ELISA) en un sitio de prueba. Se unen los anticuerpos en una muestra de prueba a los péptidos inmovilizados de la invención. Los anticuerpos de muestra de prueba contra antígenos de *Ehrlichia* apropiados se unirán entonces a un segundo conjunto de péptidos de la invención que están conjugados con una molécula detectora (p.ej. oro coloidal, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (ALP)) que detecta la presencia de los anticuerpos unidos al primer conjunto de péptidos inmovilizados en el sitio de prueba.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

50 Como se usan en la presente memoria, los siguientes términos tendrán los siguientes significados:

El término "antígeno", como se usa en la presente memoria, hace referencia a una molécula que puede ser reconocida por un anticuerpo. Un antígeno puede ser, por ejemplo, un péptido o una forma modificada del mismo. 55 Un antígeno puede comprender uno o más epítomos.

El término "epítomo", como se usa en la presente memoria, es una porción de un antígeno que se reconoce específicamente por un anticuerpo. Un epítomo, por ejemplo, puede comprender o consistir en una porción de un péptido (p.ej. un péptido de la invención). Un epítomo puede ser un epítomo lineal, epítomo secuencial o epítomo conformacional. 60

El término "proteína OMP-1" hace referencia a cualquiera de los parálogos de proteína de membrana externa 1 de *Ehrlichia* incluyendo, pero sin limitación, P-30 de *E. canis*, P30-1 de *E. canis*, P28 de *E. chaffeensis*, OMP-1C de *E. chaffeensis*, OMP-1D de *E. chaffeensis*, OMP-1E de *E. chaffeensis* y OMP-1F de *E. chaffeensis*. 65

Los términos "ácido nucleico", "oligonucleótido" y "polinucleótido" se usan intercambiabilmente en la presente

memoria y engloban ADN, ARN y ADNc tanto monocatenarios como bicatenarios, así como modificaciones químicas de los mismos.

5 Las abreviaturas de aminoácido de una letra usadas en la presente memoria tienen su significado estándar en la materia, y todas las secuencias peptídicas descritas en la presente memoria se escriben de acuerdo con la convención, con el extremo N-terminal a la izquierda y el extremo C-terminal a la derecha.

Los términos adicionales se definirán, según sea necesario, en la descripción detallada siguiente.

10 **Composiciones y dispositivos**

La presente invención está basada, en parte, en el descubrimiento de que ciertas variantes de secuencia de un fragmento de proteínas OMP-1 de *Ehrlichia* proporcionan una robusta detección de una respuesta de anticuerpo contra una serie de especies de *Ehrlichia*. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona péptidos capaces de unirse a anticuerpos que reconocen antígenos de *Ehrlichia*, como se precisa en las reivindicaciones. Se divulgan también péptidos adicionales.

En ciertas realizaciones, los péptidos de la divulgación comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1, X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-T-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-G-L-K-Q-X₁₈-W-X₂₀-G-X₂₂-X₂₃-X₂₄-X₂₅-X₂₆-X₂₇-X₂₈-X₂₉-X₃₀-X₃₁-X₃₂-X₃₃-X₃₄-X₃₅-X₃₆-X₃₇-X₃₈-X₃₉-X₄₀ (SEQ ID NO: 1) donde la SEQ ID NO: 1, como se usa a lo largo de la memoria descriptiva a menos que se especifique otra cosa, tiene las siguientes características: cada uno de X₁-X₆ y X₂₇-X₄₀ es cualquier aminoácido, X₇ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en N y Q, X₈ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en T y P, X₁₀ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en T y V, X₁₁ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en G y A, X₁₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en L y V, X₁₃ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en Y y F, X₁₈ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en D y N, X₂₀ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en D y N, X₂₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en S y V, X₂₃ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en A, S y T, X₂₄ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en A e I, X₂₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en S, T y P y X₂₆ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en S, N y K.

En ciertas realizaciones, los péptidos de la divulgación comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₇ es Q y X₂₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en T y P. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₇ es N y X₂₅ es S. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₁ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en S y K, X₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en A, V y R, X₃ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y D, X₄ es E, X₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E, D y N, y X₆ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y Q. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₁ es S, X₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en A y V, X₃ es K, X₄ es E, X₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y D y X₆ es K. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₁-X₆ tiene la secuencia K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO: 2). En ciertas realizaciones, X₂₇-X₄₀ tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 3), M-A-P-F-H-E-L-D-Y-N-N-H-P-N (SEQ ID NO: 4), S-L-N-V-S-F-L-I-D-P-M-A-P-F (SEQ ID NO: 5) y Q-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q (SEQ ID NO: 6).

En ciertas realizaciones, los péptidos de la divulgación comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₁ es S, X₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en A y V, X₃ es K, X₄ es E, X₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y D, X₆ es K, X₇ es Q y X₂₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en T y P. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₁ es S, X₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en A y V, X₃ es K, X₄ es E, X₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y D, X₆ es K, X₇ es N y X₂₅ es S. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₁ es S, X₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en A y V, X₃ es K, X₄ es E, X₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y D, X₆ es K, X₇ es Q, X₂₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en T y P y X₂₇-X₄₀ tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 3), M-A-P-F-H-E-L-D-V-N-N-H-P-N (SEQ ID NO: 4), S-L-N-V-S-F-L-I-D-P-M-A-P-F (SEQ ID NO: 5) y Q-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q (SEQ ID NO: 6). En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₁ es S, X₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en A y V, X₃ es K, X₄ es E, X₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y D, X₆ es K, X₇ es N, X₂₅ es S y X₂₇-X₄₀ tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 3), M-A-P-F-H-E-L-D-V-N-N-H-P-N (SEQ ID NO: 4), S-L-N-V-S-F-L-I-D-P-M-A-P-F (SEQ ID NO: 5) y Q-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q (SEQ ID NO: 6).

65 En ciertas realizaciones, los péptidos de la divulgación comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₁-X₆ tienen la secuencia K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO: 2), X₇ es Q y X₂₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo

consistente en T y P. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₁-X₆ tiene la secuencia K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO: 2), X₇ es N y X₂₅ es S. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₁-X₆ tienen la secuencia K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO: 2), X₇ es Q, X₂₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en T y P y X₂₇-X₄₀ tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 3), M-A-P-F-H-E-L-D-V-N-N-H-P-N (SEQ ID NO: 4), S-L-N-V-S-F-L-I-D-P-M-A-P-F (SEQ ID NO: 5) y Q-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q (SEQ ID NO: 6). En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 donde X₁-X₆ tienen la secuencia K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO: 2), X₇ es N, X₂₅ es S y X₂₇-X₄₀ tienen una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 3), M-A-P-F-H-E-L-D-V-N-N-H-P-N (SEQ ID NO: 4), S-L-N-V-S-F-L-I-D-P-M-A-P-F (SEQ ID NO: 5) y Q-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q (SEQ ID NO: 6).

En ciertas realizaciones, un péptido de la divulgación comprende o consiste en la secuencia S-A-K-E-E-K-Q-T-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-T-S-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 7); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-T-S-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 8); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-T-S-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 9); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-T-S-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 10); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-T-S-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 11); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-T-S-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 12); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-T-S-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 13); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-T-S-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 14); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-P-S-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 15); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-P-S-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 16); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-P-S-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 17); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-P-S-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 18); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-P-S-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 19); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-P-S-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 20); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-P-S-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 21) o S-A-K-E-E-K-Q-P-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-P-S-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 22). En cualquiera de las realizaciones de este párrafo, los primeros 6 residuos aminoácidos del péptido pueden reemplazarse por una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en S-V-K-E-E-K (SEQ ID NO: 23), S-A-K-E-D-K (SEQ ID NO: 24), S-A-K-E-E-K (SEQ ID NO: 25) y K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO: 26). En cualquiera de las reivindicaciones de este párrafo, los últimos 14 residuos aminoácidos del péptido pueden reemplazarse por una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 3), M-A-P-F-H-E-L-D-V-N-N-H-P-N (SEQ ID NO: 4), S-L-N-V-S-F-L-I-D-P-M-A-P-F (SEQ ID NO: 5) y Q-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q (SEQ ID NO: 6).

En ciertas realizaciones, un péptido de la divulgación comprende o consiste en la secuencia S-A-K-E-E-K-Q-T-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-T-N-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 27); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-T-N-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 28); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-T-N-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 29); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-T-N-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 30); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-V-D-G-V-A-A-T-N-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 31); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-T-N-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 32); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-T-N-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 33); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-T-N-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 34); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-P-N-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 35); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-P-N-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 36); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-P-N-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 37); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-P-N-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 38); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-P-N-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 39); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-P-N-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 40); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-P-N-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 41) o S-A-K-E-E-K-Q-P-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-P-N-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 42). En cualquiera de las realizaciones de este párrafo, los primeros 6 residuos aminoácidos del péptido pueden reemplazarse por una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en S-V-K-E-E-K (SEQ ID NO: 23), S-A-K-E-D-K (SEQ ID NO: 24), S-A-K-E-E-K (SEQ ID NO: 25) y K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO: 26).

En ciertas realizaciones, un péptido de la divulgación comprende o consiste en la secuencia S-A-K-E-E-K-Q-T-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-T-K-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 43); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-T-K-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 44); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-T-K-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 45); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-T-K-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 46); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-T-K-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 47); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-T-K-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 48); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-T-K-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 49); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-T-K-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 50); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-P-K-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 51); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-P-K-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 52); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-P-K-Q-R-K-N-

D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 53); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-S-A-A-P-K-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 54); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-P-K-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 55); S-A-K-E-E-K-Q-P-T-T-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-P-K-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 56); S-A-K-E-E-K-Q-T-T-Y-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-Y-A-A-P-K-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 57) o S-A-K-E-E-K-Q-P-T-V-G-L-Y-G-L-K-Q-D-W-D-G-V-A-A-P-K-Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 58). En cualquiera de las realizaciones de este párrafo, los primeros 6 residuos aminoacídicos del péptido pueden reemplazarse por una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en S-V-K-E-E-K (SEQ ID NO: 23), S-A-K-E-D-K (SEQ ID NO: 24), S-A-K-E-E-K (SEQ ID NO: 25) y K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO: 26). En cualquiera de las realizaciones de este párrafo, los 14 últimos residuos aminoacídicos del péptido pueden reemplazarse por una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E (SEQ ID NO: 3), M-A-P-F-H-E-L-D-V-N-N-H-P-N (SEQ ID NO: 4), S-L-N-V-S-F-L-I-D-P-M-A-P-F (SEQ ID NO: 5) y Q-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q (SEQ ID NO: 6).

Como se precisa en las reivindicaciones, los péptidos de la invención comprenden o consisten en una secuencia de SEQ ID NO: 59, F-S-A-K-X₅-X₆-X₇-A-E-T-X₁₁-X₁₂-T-F-G-X₁₆-X₁₇-X₁₈-X₁₉-X₂₀-D-G-A-X₂₄-X₂₅-X₂₆-X₂₇-N-X₂₉-V-X₃₁-N-X₃₃-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 59) donde X₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q, X₆ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q, X₇ es cualquier aminoácido, X₁₁ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y R, X₁₂ es cualquier aminoácido, X₁₆ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en L e I, X₁₇ es cualquier aminoácido, X₁₈ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en R y K, X₁₉ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en Q y N, X₂₀ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en Y y T, X₂₄ es cualquier aminoácido, X₂₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en I y L, X₂₆ es cualquier aminoácido, X₂₇ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en D y E, X₂₉ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q, X₃₁ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q y X₃₃ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y R.

En ciertas realizaciones, los péptidos de la invención comprenden o consisten en una secuencia de SEQ ID NO: 59 donde X₅ es E, X₆ es E, X₁₆ es L, X₁₈ es K, X₂₀ es Y, X₂₅ es I, X₂₉ es Q, X₃₁ es Q y X₃₃ es K. En otras realizaciones, los péptidos de la invención comprenden o consisten en una secuencia de SEQ ID NO: 59 donde X₇ es K, X₁₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y R, X₁₇ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y D, X₂₄ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y Q y X₂₆ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y T.

En ciertas realizaciones, un péptido de la invención comprende o consiste en la secuencia F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-K-K-T-F-G-L-E-K-N-Y-D-G-A-K-I-E-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 60); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-K-K-T-F-G-L-E-K-N-Y-D-G-A-K-I-T-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 61); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-K-K-T-F-G-L-E-K-N-Y-D-G-A-Q-I-E-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 62); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-K-K-T-F-G-L-E-K-N-Y-D-G-A-Q-I-T-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 63); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-K-K-T-F-G-L-D-K-N-Y-D-G-A-K-I-E-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 64); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-K-K-T-F-G-L-D-K-N-Y-D-G-A-K-I-T-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 65); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-K-K-T-F-G-L-D-K-N-Y-D-G-A-Q-I-E-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 66); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-K-K-T-F-G-L-D-K-N-Y-D-G-A-Q-I-T-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 67); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-K-R-T-F-G-L-E-K-N-Y-D-G-A-K-I-E-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 68); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-K-R-T-F-G-L-E-K-N-Y-D-G-A-K-I-T-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 69); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-K-R-T-F-G-L-E-K-N-Y-D-G-A-Q-I-E-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 70); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-K-R-T-F-G-L-E-K-N-Y-D-G-A-Q-I-T-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 71); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-K-R-T-F-G-L-D-K-N-Y-D-G-A-K-I-T-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 72); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-K-R-T-F-G-L-D-K-N-Y-D-G-A-K-I-E-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 73); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-K-R-T-F-G-L-D-K-N-Y-D-G-A-Q-I-E-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 74) o F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-K-R-T-F-G-L-D-K-N-Y-D-G-A-Q-I-T-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 75).

En otras realizaciones, un péptido de la invención comprende o consiste en la secuencia F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-R-K-T-F-G-L-E-K-Q-Y-D-G-A-K-I-E-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 76); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-R-K-T-F-G-L-E-K-Q-Y-D-G-A-K-I-T-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 77); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-R-K-T-F-G-L-E-K-Q-Y-D-C-A-Q-I-E-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 78); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-R-K-T-F-G-L-E-K-Q-Y-D-G-A-Q-I-T-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 79); F-S-A-K-E-E-K-A-E-I-R-K-T-F-C-L-D-K-Q-Y-D-G-A-K-I-E-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 80); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-R-K-T-F-G-L-D-K-Q-Y-D-G-A-K-I-T-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 81); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-R-K-T-P-G-L-D-K-Q-Y-D-G-A-Q-I-E-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 82); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-R-K-T-F-G-L-D-K-Q-Y-D-G-A-Q-I-T-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 83); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-R-R-T-F-G-L-E-K-Q-Y-D-G-A-K-I-E-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 84); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-R-R-T-F-G-L-E-K-Q-Y-D-G-A-K-I-T-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 85); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-R-R-T-F-G-L-E-K-Q-Y-D-G-A-Q-I-E-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 86); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-R-R-T-F-G-L-E-K-Q-Y-D-G-A-Q-I-T-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 87); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-R-R-T-F-G-L-D-K-Q-Y-D-G-A-K-I-T-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 88); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-R-R-T-F-G-L-D-K-Q-Y-D-G-A-K-I-E-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 89); F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-R-R-T-F-G-L-D-K-Q-Y-D-G-A-Q-I-E-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 90) o F-S-A-K-E-E-K-A-E-T-R-R-T-F-G-L-D-K-Q-Y-D-G-A-Q-I-T-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 91).

En algunas realizaciones, los péptidos de la divulgación comprenden o consisten en una secuencia de SEQ ID NO:

92, G-X₂-F-S-A-K-X₇-X₈-K-X₁₀-A-D-T-R-X₁₅-T-F-G-L-X₂₀-K-Q-T-D-G-A-X₂₇-I-X₂₉-E-N-X₃₂-V-X₃₄-N-X₃₆-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 92) donde X₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en D y N, X₇ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q, X₈ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q, X₁₀ es cualquier aminoácido, X₁₅ es cualquier aminoácido, X₂₀ es cualquier aminoácido, X₂₇ es cualquier aminoácido, X₂₉ es cualquier aminoácido, X₃₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q, X₃₄ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q y X₃₆ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y R. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden o consisten en una secuencia de SEQ ID NO: 92 donde X₂ es N, X₇ es E, X₈ es E, X₃₂ es Q, X₃₄ es Q y X₃₆ es K. En otras realizaciones, los péptidos comprenden o consisten en una secuencia de SEQ ID NO: 93, DNQVQNKFTISNYSFKYEDNP (SEQ ID NO: 93).

En ciertas realizaciones, los péptidos divulgados en la presente memoria comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 92 y una secuencia peptídica N-terminal adicional (p.ej. una extensión N-terminal). Los péptidos de la invención pueden comprender una secuencia de SEQ ID NO: 59 como se define en las reivindicaciones y una secuencia peptídica N-terminal adicional (p.ej. una extensión N-terminal). La secuencia peptídica N-terminal adicional puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 o más aminoácidos. En ciertas realizaciones, la secuencia peptídica N-terminal tiene una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15, de aproximadamente 15 a aproximadamente 20, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25, de aproximadamente 25 a aproximadamente 30, de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 o de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 aminoácidos. En una realización, la secuencia peptídica N-terminal puede ser G-N o G-D. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los péptidos de la invención comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 59 y una secuencia peptídica N-terminal adicional G-N o G-D. La secuencia peptídica N-terminal adicional puede ser una secuencia nativa. Como se usa en la presente memoria, una secuencia "nativa" es una secuencia peptídica de una secuencia de OMP-1 de *Ehrlichia* de origen natural, o una variante de la misma. En ciertas realizaciones, la secuencia peptídica es un fragmento de una secuencia de OMP-1 de *Ehrlichia* de origen natural. La secuencia peptídica puede ser, p.ej., de una región conservada o no conservada de OMP-1. La secuencia peptídica puede comprender, p.ej., un epítipo tal como un epítipo inmunodominante o cualquier otro epítipo reconocible por el sistema inmunitario del hospedador (p.ej., humano, de perro, etc.). Se han descrito proteínas OMP-1 y péptidos de las mismas, p.ej., en las patentes de EE.UU. n° 6.544.517, 6.893.640, 6.923.963, 7.063.846 y 7.407.770, las solicitudes de patente de EE.UU. 2004/0265333 y 2009/0075368 y la patente europea n° 1026949.

Los polipéptidos variantes son al menos aproximadamente un 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % idénticos a un péptido mostrado en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7-22 y SEQ ID NO: 27-94 y se divulgan también. La identidad porcentual de secuencia tiene el significado reconocido en la materia y hay una serie de procedimientos para medir la identidad entre dos secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas. Véanse, 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, Part 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 procedimientos para alinear 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, Wis. 53711) que usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Adv. App. Math.*, 2: 482-489 (1981)). Por ejemplo, puede usarse el programa informático ALIGN que emplea el algoritmo FASTA, con una búsqueda de hueco afín con una penalización por hueco abierto de -12 y una penalización por extensión de hueco de -2.

Cuando se usa cualquiera de los programas de alineamiento de secuencia para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, aproximadamente un 95 % idéntica a una secuencia de referencia, se fijan los parámetros de modo que se calcule el porcentaje de identidad para toda la longitud del polinucleótido de referencia y que se permitan huecos en la identidad de hasta un 5 % del número total de nucleótidos en el polinucleótido de referencia.

Las variantes de las secuencias peptídicas pueden seleccionarse fácilmente por un especialista en la materia basándose en parte en las propiedades conocidas de la secuencia. Por ejemplo, un péptido variante puede incluir sustituciones aminoacídicas (p.ej., sustituciones aminoacídicas conservativas) y/o deleciones (p.ej., deleciones aminoacídicas pequeñas de un aminoácido o deleciones que engloban 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 o más aminoácidos contiguos). Por tanto, en ciertas realizaciones, es una variante de un péptido nativo aquella que difiere de una secuencia de origen natural en (i) uno o más (p.ej. 2, 3, 4, 5, 6 o más) sustituciones aminoacídicas conservativas, (ii) la deleción de 1 o más ((p.ej., 2, 3, 4, 5, 6 o más) aminoácidos o (iii) una combinación de los mismos. Los aminoácidos eliminados pueden ser contiguos o no contiguos. Las sustituciones aminoacídicas conservativas son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales y propiedades químicas. Estas incluyen, p.ej., (1) aminoácidos ácidos: aspartato y glutamato; (2) aminoácidos básicos: lisina, arginina e histidina; (3) aminoácidos no polares: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano; (4) aminoácidos polares no cargados: glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina; (5) aminoácidos alifáticos: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina y treonina, con serina y

treonina agrupados opcionalmente como hidroxilo alifático; (6) aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano; (7) aminoácidos de amida: asparagina y glutamina y (9) aminoácidos que contienen azufre: cisteína y metionina. Véase, p. ej. "Biochemistry", 2ª ed., Ed. por L. Stryer, WH Freeman and Co.: 1981. Los procedimientos para confirmar que los péptidos variantes son adecuados son convencionales y rutinarios.

Las variantes de las secuencias peptídicas engloban variaciones de secuencias peptídicas definidas anteriormente. Por ejemplo, una secuencia peptídica anteriormente descrita que comprende un epítipo conocido puede alargarse o acortarse, en uno o ambos extremos (p.ej. en aproximadamente 1-3 aminoácidos) y/o pueden sustituirse 1, 2, 3, 4 o más aminoácidos por aminoácidos conservativos, etc. Además, si se ha identificado una región de una proteína que contiene un epítipo de interés, un investigador puede "desplazar" la región de interés (p.ej. en aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier dirección) desde los puntos finales de la región bruta original para optimizar la actividad.

En ciertas realizaciones, la secuencia peptídica N-terminal adicional puede comprender o consistir en otro péptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 92. Por tanto, en algunas realizaciones, un péptido divulgado en la presente memoria puede ser un multímero de secuencias que tienen una secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 92. En otras realizaciones, la secuencia peptídica N-terminal es una secuencia peptídica de OMP-1 nativa que está naturalmente adyacente al extremo N-terminal de una secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 92. Por ejemplo, en una realización, el péptido puede comprender un multímero de SEQ ID NO: 94, (KEEKAETKTRTFGLEKQYDGAKIEENQVQNKGGGG)_N donde N= 1-10. En otras realizaciones, el péptido puede comprender una fusión de secuencias de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 94 opcionalmente a través de uno o más aminoácidos ligadores. Por ejemplo, en una realización, el péptido puede comprender una secuencia de SEQ ID NO: 1 ligada a la SEQ ID NO: 94 opcionalmente a través de uno o más aminoácidos ligadores (p.ej. residuos de glicina). En otra realización, el péptido puede comprender una secuencia de SEQ ID NO: 1 ligada a la SEQ ID NO: 92 opcionalmente a través de uno o más aminoácidos ligadores (p.ej., residuos de glicina).

Como se precisa en las reivindicaciones, cualquier secuencia peptídica N-terminal adicional es una secuencia no nativa. Como se usa en la presente memoria, una secuencia "no nativa" es cualquier secuencia proteica, tanto de una proteína de *Ehrlichia* como de otra, distinta de una secuencia peptídica de OMP-1 nativa. En ciertas realizaciones, la secuencia peptídica N-terminal adicional comprende un epítipo de un antígeno de superficie de *Ehrlichia*. En ciertas realizaciones, la secuencia peptídica N-terminal adicional comprende un epítipo antigénico de *Ehrlichia* tal como p38, p43, p120, p140, p153, p156, p200, gp19, gp36, gp47, gp200 o HGE-3. Se han descrito secuencias proteicas y peptídicas correspondientes a antígenos de *Ehrlichia*. Véanse, p.ej., las patentes de EE.UU. nº 6.306.402, 6.355.777, 7.204.992 y 7.407.770 y el documento WO2006/138509. Pueden usarse también polipéptidos o péptidos derivados de otros microorganismos.

En ciertas realizaciones, la secuencia peptídica N-terminal adicional es una combinación de secuencias. Por ejemplo, la secuencia peptídica N-terminal adicional puede comprender una secuencia nativa, una secuencia no nativa o cualquier combinación de dichas secuencias (p.ej., dos o más secuencias nativas, dos o más secuencias no nativas o una o más secuencias nativas en combinación con una o más secuencias no nativas).

En ciertas realizaciones, los péptidos divulgados en la presente memoria comprenden una secuencia definida por la SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 92 y comprenden además una secuencia C-terminal adicional. Los péptidos de la invención pueden comprender una secuencia de SEQ ID NO: 59 como se define en las reivindicaciones y una secuencia C-terminal adicional. La secuencia peptídica C-terminal adicional puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 o más aminoácidos. En ciertas realizaciones, la secuencia C-terminal adicional tiene una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15, de aproximadamente 15 a aproximadamente 20, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25, de aproximadamente 25 a aproximadamente 30, de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 o de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 aminoácidos. La secuencia peptídica C-terminal adicional puede ser una secuencia de OMP-1 nativa. En ciertas realizaciones, la secuencia peptídica C-terminal es un fragmento de una secuencia de OMP-1 de *Ehrlichia* de origen natural. La secuencia peptídica puede ser, p.ej., de una región conservada o no conservada de OMP-1. La secuencia peptídica puede comprender, p.ej. un epítipo tal como un epítipo inmunodominante o cualquier otro epítipo reconocible por el sistema inmunitario del hospedador (p.ej., humano, de perro, etc.). En ciertas realizaciones, la secuencia peptídica C-terminal adicional puede comprender o consistir en otro péptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 92. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un péptido de la invención puede ser un multímero de secuencias que tienen cada una una secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 92. En otras realizaciones, la secuencia nativa es una secuencia de OMP-1 que está naturalmente adyacente al extremo C-terminal de una secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 92.

En ciertas realizaciones, la secuencia peptídica C-terminal adicional es una secuencia no nativa. En ciertas realizaciones, la secuencia peptídica C-terminal adicional comprende un epítipo de un antígeno de superficie de *Ehrlichia* distinto de OMP-1. En ciertas realizaciones, la secuencia peptídica C-terminal adicional comprende un epítipo antigénico de *Ehrlichia* tal como p38, p43, p120, p140, p153, p156, p200, gp19, gp36, gp47, gp200 o HGE-3. Pueden usarse también polipéptidos o péptidos derivados de otros microorganismos.

En ciertas realizaciones, la secuencia peptídica C-terminal adicional es una combinación de secuencias. Por ejemplo, la secuencia peptídica C-terminal adicional puede comprender una secuencia nativa, una secuencia no nativa o cualquier combinación de dichas secuencias (p.ej. dos o más secuencias nativas, dos o más secuencias no nativas o una o más secuencias nativas en combinación con una o más secuencias no nativas).

En ciertas realizaciones, los péptidos divulgados en la presente memoria comprenden una secuencia definida por la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 92 y comprenden además una secuencia peptídica N-terminal adicional y una secuencia peptídica C-terminal adicional. Las secuencias peptídicas N-terminales y C-terminales adicionales pueden ser como se describe anteriormente. Los péptidos divulgados en la presente memoria no consisten en una proteína OMP-1 completa. Sin embargo, en ciertas realizaciones, los péptidos pueden comprender una proteína OMP-1 completa. En otras realizaciones, los péptidos no comprenden una proteína OMP-1 completa.

Puede diseñarse un péptido que comprende una secuencia peptídica N-terminal y/o C-terminal adicional para diagnosticar infecciones por *Ehrlichia* tempranamente después de la infección (p.ej. al cabo de una a dos semanas después del inicio de la infección). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la secuencia peptídica N-terminal y/o C-terminal adicional comprende un antígeno o epítipo asociado a las etapas tempranas de la infección por *Ehrlichia*.

Además de las secuencias descritas anteriormente, las secuencias N-terminales y C-terminales adicionales pueden comprender o consistir en una secuencia flexible, diseñada para presentar mejor los péptidos de la invención para detección en un inmunoensayo (p.ej., ensayo ELISA, inmunoensayo de flujo lateral, ensayo de aglutinación, etc.). Dichas secuencias flexibles pueden identificarse fácilmente por especialistas en la materia.

En ciertas realizaciones, los péptidos divulgados en la presente memoria comprenden o consisten en 25 o más (p.ej. 26, 27, 28, 29 o más) residuos aminoacídicos. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden o consisten en 30 o más (p.ej., 31, 32, 33, 34 o más) residuos aminoacídicos. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden o consisten en 35 o más (p.ej. 36, 37, 38, 39 o más) residuos aminoacídicos. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden o consisten en 40 o más (p.ej., 41, 42, 43, 44 o más) residuos aminoacídicos. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden o consisten en 45 o más (p.ej. 46, 47, 48, 49 o más) residuos aminoacídicos. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden o consisten en 50 o más (p.ej. 51, 52, 53, 54 o más) residuos aminoacídicos. En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden o consisten en 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más residuos aminoacídicos.

En ciertas realizaciones, los péptidos divulgados en la presente memoria comprenden un epítipo de una secuencia peptídica descrita en la presente memoria. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los péptidos comprenden un epítipo de una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 27 a SEQ ID NO: 94.

En ciertas realizaciones, los péptidos divulgados en la presente memoria comprenden un fragmento de una secuencia peptídica descrita en la presente memoria. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los péptidos comprenden un fragmento de una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 27 a SEQ ID NO: 94. El fragmento puede ser, p.ej., de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 o 44 aminoácidos de longitud. El fragmento puede ser contiguo o puede incluir una o más deleciones (p.ej. una deleción de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más residuos aminoacídicos). En ciertas realizaciones, el fragmento comprende una secuencia expuesta en las patentes de EE.UU. n° 6.306.402, 6.355.777, 7.204.992 o 7.407.770 o en el documento WO2006/138509. En ciertas realizaciones, el fragmento no consiste en una secuencia expuesta en una o más de las patentes de EE.UU. n° 6.306.402, 6.355.777, 7.204.992 y 7.407.770 y el documento WO2006/138509. Los péptidos que comprenden un fragmento de una secuencia peptídica descrita en la presente memoria pueden comprender además una secuencia peptídica N-terminal adicional, una secuencia peptídica C-terminal adicional o una combinación de las mismas. Las secuencias peptídicas N-terminales o C-terminales adicionales pueden ser como se describe anteriormente.

Los péptidos de la invención que comprenden una secuencia peptídica N-terminal o C-terminal adicional pueden comprender además un ligador que conecta el péptido (p.ej. un péptido de SEQ ID NO: 59) con la secuencia peptídica N-terminal o C-terminal adicional. El ligador puede ser, p.ej., un espaciador peptídico. Dicho espaciador puede consistir, por ejemplo, en entre aproximadamente 1 y 5 (p.ej. aproximadamente 3) residuos aminoacídicos, preferiblemente aminoácidos no cargados, p.ej., residuos alifáticos tales como glicina o alanina. En una realización, el espaciador es un espaciador de triplete de glicina. En otra realización, el espaciador es un espaciador de triplete de alanina. En aún otra realización, el espaciador comprende tanto residuos de glicina como de alanina. Como alternativa, el ligador puede ser un ligador químico (p.ej. no peptídico).

En ciertas realizaciones, los péptidos de la invención se producen mediante química sintética (concretamente un "péptido sintético"). En otras realizaciones, los péptidos de la invención se producen biológicamente, concretamente mediante la maquinaria celular, tal como ribosomas). Los péptidos de la invención están aislados. Como se usa en la presente memoria, un péptido "aislado" es un péptido que se ha producido sintética o biológicamente y después purificado, al menos parcialmente, de los productos químicos y/o la maquinaria celular usados para producir el

péptido. En ciertas realizaciones, un péptido aislado de la invención está sustancialmente purificado. El término "sustancialmente purificado", como se usa en la presente memoria, hace referencia a una molécula, tal como un péptido, que está sustancialmente exenta de material celular (proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, etc.), medio de cultivo, precursores químicos, productos químicos usados para la síntesis del péptido o combinaciones de los mismos. Un péptido que está sustancialmente purificado tiene menos de aproximadamente un 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 % o menos del material celular, medio de cultivo, otros polipéptidos, precursores químicos y/o productos químicos usados en la síntesis del péptido. Por consiguiente, una molécula sustancialmente pura, tal como un péptido, puede ser al menos aproximadamente un 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % en peso seco la molécula de interés. Un péptido aislado de la invención puede estar en agua, un tampón o en forma seca esperando la reconstitución, p.ej. como parte de un kit. Un péptido aislado de la presente invención puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Los ácidos y bases adecuados que pueden formar sales con los péptidos de la presente invención son bien conocidos por los especialistas en la materia, e incluyen ácidos y bases inorgánicos y orgánicos.

En ciertas realizaciones, los péptidos de la invención se purifican por afinidad. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los péptidos de la invención se purifican mediante su capacidad de unirse a anticuerpos anti-*Ehrlichia* (p.ej. anticuerpos contra proteínas OMP-1 y, opcionalmente, otros antígenos de *Ehrlichia*) poniendo en contacto dichos anticuerpos con los péptidos de la invención de tal modo que puedan formarse complejos de péptido-anticuerpo, lavarse los complejos de péptido-anticuerpo para retirar impurezas y eluir entonces los péptidos de los anticuerpos. Los anticuerpos pueden, p.ej., enlazarse con un soporte sólido. Los procedimientos de purificación por afinidad son bien conocidos y rutinarios para los especialistas en la materia.

En ciertas realizaciones, los péptidos de la invención están modificados. Los péptidos de la invención pueden modificarse mediante una variedad de técnicas tales como mediante desnaturalización con calor y/o detergente (p.ej. SDS). Como alternativa, los péptidos de la invención pueden modificarse mediante asociación con uno o más restos adicionales. La asociación puede ser covalente o no covalente y puede ser, por ejemplo, a través de un ligador aminoácido terminal, tal como lisina o cisteína, un agente de acoplamiento químico o un enlace peptídico. El resto adicional puede ser, por ejemplo, un ligando, un receptor de ligando, un ligando de fusión, un marcaje detectable, una enzima o un sustrato que inmovilice el péptido.

Los péptidos de la invención pueden conjugarse con un ligando tal como biotina (p.ej. a través de un residuo de cisteína o lisina), una molécula lipídica (p.ej. a través de un residuo de cisteína) o una proteína vehículo (p.ej. seroalbúmina, dominio Fc de inmunoglobulina a través de, p.ej., un residuo de cisteína o lisina). El enlazamiento con ligandos tales como biotina puede ser útil para asociar el péptido con receptores de ligando tales como avidina, estreptavidina, estreptavidina polimérica (véanse, p.ej., los documentos US 2010/0081125 y US 2010/0267166), o neutravidina. La avidina, estreptavidina, estreptavidina polimérica o neutravidina pueden, a su vez, ligarse con un resto de señalización (p.ej. una enzima tal como peroxidasa de rábano picante (HRP) o fosfatasa alcalina u otro resto que pueda visualizarse, tal como oro coloidal o un resto fluorescente) o un sustrato sólido (p.ej. membrana Immobilon™ o de nitrocelulosa). Como alternativa, los péptidos de la invención pueden fusionarse o ligarse con un receptor de ligando tal como avidina, estreptavidina, estreptavidina polimérica o neutravidina, facilitando así la asociación de los péptidos con el correspondiente ligando tal como biotina y cualquier resto (p.ej. resto de señalización) o sustrato sólido enlazado con el mismo. Los ejemplos de otros pares de ligando-receptor son bien conocidos en la materia y pueden usarse de forma similar.

Los péptidos de la invención pueden fusionarse con un ligando de fusión (p.ej. un péptido u otro resto) que pueda usarse para mejorar la purificación, para potenciar la expresión del péptido en una célula hospedadora, para ayudar a la detección, para estabilizar el péptido, etc. Los ejemplos de compuestos adecuados para ligandos de unión incluyen proteínas vehículo (p.ej. seroalbúmina, dominio Fc de inmunoglobulina), peroxidasa de rábano picante (HRP), beta-galactosidasa, glutathion-S-transferasa, un marcaje de histidina, etc. La fusión puede conseguirse mediante, p.ej., un enlace peptídico. Por ejemplo, los péptidos de la invención y los ligandos de fusión pueden ser proteínas de fusión y pueden fusionarse directamente en fase o pueden comprender un ligador peptídico, como se discute anteriormente en el contexto de secuencias peptídicas N-terminales y C-terminales adicionales.

Además, los péptidos de la invención pueden modificarse para incluir cualquiera de una variedad de grupos químicos o moléculas conocidos. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, glicosilación, acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, enlazamiento covalente con polietilenglicol (p.ej. PEGilación), enlazamiento covalente de flavina, enlazamiento covalente de un resto hemo, enlazamiento covalente de un nucleótido o derivado nucleotídico, enlazamiento covalente de un lípido o derivado lipídico, enlazamiento covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de puente disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glicosilación, formación de anclajes de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, ubiquitinación, modificaciones con ácidos grasos, adición de aminoácidos a proteínas mediada por transferencia de ARN tal como arginilación, etc. Se incluyen también análogos de aminoácidos (incluyendo aminoácidos no naturales) y péptidos con ligamientos sustituidos. Los péptidos de la invención que consisten en cualquiera de las secuencias discutidas en la presente memoria pueden modificarse mediante cualquiera de las modificaciones discutidas. Dichos péptidos siguen

“consistiendo en” aminoácidos.

Las modificaciones como se exponen anteriormente son bien conocidas por los especialistas en la materia y se han descrito con gran detalle en la bibliografía científica. Se describen varias modificaciones particularmente comunes, glicosilación, enlazamiento lipídico, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ribosilación de ADP, por ejemplo, en muchos textos básicos tales como “Proteins-Structure and Molecular Properties”, 2ª ed., T. E. Creighton, W.H. Freeman and Company, Nueva York (1993). Están disponibles muchas revisiones detalladas sobre este tema, tales como Wold, F “Posttranslational Covalent Modification of Proteins”, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York 1-12 (1983); Seifter et al. (1990) Meth. Enzymol. 182: 626-646 y Rattan et al. (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 48-62.

En ciertas realizaciones, los péptidos de la invención se enlazan con o se inmovilizan sobre un sustrato tal como un soporte sólido o semisólido. El enlazamiento puede ser covalente o no covalente, y puede facilitarse por un resto asociado al péptido que posibilita la unión covalente o no covalente, tal como un resto que tiene una alta afinidad por un componente enlazado con el vehículo, soporte o superficie. Por ejemplo, el péptido puede estar asociado a un ligando tal como biotina, y el componente asociado a la superficie puede ser un correspondiente receptor de ligando tal como avidina. El péptido puede enlazarse con o inmovilizarse sobre el sustrato antes o después de la adición de una muestra que contiene anticuerpo durante un inmunoensayo.

En ciertas realizaciones, el sustrato es una perla, tal como una partícula coloidal (p.ej. una nanopartícula coloidal compuesta de oro, plata, platino, cobre, combinaciones metálicas, otros metales blandos, partículas de estructura núcleo-cubierta o nanoesferas de oro huecas) u otro tipo de partícula (p.ej. una perla magnética o una partícula o nanopartícula que comprende sílice, látex, poliestireno, policarbonato, poliacrilato o PVDF). Dichas partículas pueden comprender un marcaje (p.ej. un marcaje colorimétrico, quimioluminiscente o fluorescente) y pueden ser útiles para visualizar la localización de los péptidos durante los inmunoensayos. En ciertas realizaciones, se usa una cisteína terminal del péptido de la invención para unir el péptido directamente con las nanopartículas compuestas de oro, plata, platino, cobre, combinaciones metálicas, otros metales blandos, etc.

En ciertas realizaciones, el sustrato es una transferencia puntual o una ruta de flujo lateral en un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral. Por ejemplo, los péptidos pueden enlazarse con o inmovilizarse sobre una membrana porosa, tal como una membrana de PVDF (p.ej. una membrana Immobilon™), una membrana de nitrocelulosa, una membrana de polietileno, una membrana de nailon o un tipo similar de membrana.

En ciertas realizaciones, el sustrato es una ruta de flujo en un rotor analítico. En otras realizaciones, el sustrato es un tubo o un pocillo, tal como un pocillo en una placa (p.ej. una placa de microvaloración) adecuado para uso en un ensayo ELISA. Dichos sustratos pueden comprender vidrio, materiales basados en celulosa, polímeros termoplásticos tales como polietileno, polipropileno o poliéster, estructuras sinterizadas compuestas por materiales particulados (p.ej. vidrio o diversos polímeros termoplásticos) o película de membrana colada compuesta por nitrocelulosa, nailon, polisulfona o similares. Un sustrato puede ser partículas finas de polietileno sinterizado, conocido comúnmente como polietileno poroso, por ejemplo polietileno poroso de 0,2-15 micrómetros de Chromex Corporation (Albuquerque, NM). Todos estos materiales de sustrato pueden usarse en formas adecuadas, tales como películas, láminas o placas, o pueden recubrirse sobre o unirse a o laminarse sobre vehículos inertes apropiados, tales como papel, vidrio, películas de plástico o tela. Los procedimientos adecuados para inmovilizar péptidos sobre fases sólidas incluyen interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares.

Por consiguiente, se divulgan también en la presente memoria dispositivos. En ciertas realizaciones, los dispositivos son útiles para efectuar un inmunoensayo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el dispositivo es un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral. En otras realizaciones, el dispositivo es un rotor analítico. En otras realizaciones, el dispositivo es una transferencia puntual. En otras realizaciones, el dispositivo es un tubo o un pocillo, p.ej. en una placa adecuada para un ensayo ELISA. En aún otras realizaciones, el dispositivo es un sensor electroquímico, un sensor óptico o un sensor optoelectrónico.

En ciertas realizaciones, el dispositivo comprende un péptido de la invención. En otras realizaciones, el dispositivo comprende una mezcla de péptidos diferentes. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el dispositivo comprende 2, 3, 4 o más péptidos diferentes. En ciertas realizaciones, el péptido o cada péptido de la mezcla comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 92. En otras realizaciones, el péptido o cada péptido de la mezcla comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, los péptidos se enlazan con o se inmovilizan sobre el dispositivo.

Se divulgan también en la presente memoria composiciones que comprenden uno o más péptidos divulgados en la presente memoria. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la composición puede comprender un péptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1, o mezclas de los mismos. En ciertas realizaciones, la realización comprende una mezcla de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 o más péptidos (p.ej. todos los péptidos posibles definidos por la SEQ ID NO; 1). En ciertas realizaciones, los péptidos comprenden una adición N-terminal y/o C-terminal y/o están modificados (p.ej. mediante asociación con uno o más restos adicionales) como se describe en la presente memoria. En ciertas realizaciones, los péptidos

comprenden las mismas adiciones N-terminales y/o C-terminales. En otras realizaciones, los péptidos comprenden diferentes adiciones N-terminales y/o C-terminales. En aún otras realizaciones, se proporciona una composición que comprende un péptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 92 o mezclas de las mismas. En ciertas realizaciones, la composición comprende una mezcla de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 o más péptidos (p.ej. todos los péptidos posibles definidos por la SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 92).

En ciertas realizaciones, las composiciones comprenden uno o más péptidos divulgados en la presente memoria y uno o más péptidos adicionales, tales como un péptido o antígeno de *Ehrlichia*, un péptido o antígeno de una o más especies de *Ehrlichia* infecciosas o un péptido o antígeno de uno o más agentes causantes de ehrliquiosis monocítica. El péptido o antígeno de *Ehrlichia* puede ser cualquier péptido o antígeno de superficie descrito en la presente memoria (p.ej. cualquier péptido o antígeno de una proteína OMP-1, p38, p43, p120, p140, p153, p156, p200, gp19, gp36, gp47, gp200 o HGE-3, o cualquier fragmento o epitopo del mismo. La combinación pueden comprender un cóctel (mezcla sencilla) de péptidos o polipéptidos individuales, puede estar en forma de un péptido o polipéptido de fusión (p.ej. un péptido multimérico) o los péptidos pueden ligarse por un dendrímero (p.ej. como en una estructura de MAPS). Un péptido puede fusionarse en su extremo N o extremo C con otro péptido adecuado. Dos o más copias de un péptido pueden unirse entre sí, solas o en combinación con uno o más péptidos adicionales. Pueden usarse combinaciones de péptidos o polipéptidos fusionados y no fusionados. En una realización, el péptido o péptidos adicionales contienen epítopos de linfocitos B o linfocitos T de un péptido o antígeno de *Ehrlichia*, un péptido o antígeno de una especie de *Ehrlichia* infecciosa o un péptido o antígeno de un agente causante de ehrliquiosis monocítica.

En otro aspecto, se divulgan en la presente memoria ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica un péptido de la invención. Los ácidos nucleicos de la divulgación contienen menos de un genoma microbiano entero y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. El ácido nucleico puede ser ARN, ADN, ADNc, ADN genómico, ARN o ADN sintetizado químicamente o combinaciones de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden purificarse de otros componentes, tales como proteínas, lípidos y otros polinucleótidos. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden purificarse un 50, 75, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 %. Los ácidos nucleicos codifican los péptidos descritos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos codifican un péptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7-22 o SEQ ID NO: 27-94 o combinaciones de las mismas. Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender otras secuencias nucleotídicas tales como secuencias de codificación de ligadores, secuencias señal, secuencias de terminación de transferencia TMR, dominios transmembrana o ligandos útiles en la purificación de proteínas tales como glutation-S-transferasa, marcaje de histidina y proteína A estafilocócica.

Los ácidos nucleicos divulgados en la presente memoria pueden aislarse. Un ácido nucleico "aislado" es aquel que no es inmediatamente contiguo a una o ambas de las secuencias genómicas flanqueantes 5' y 3' con las que está naturalmente asociado. Un ácido nucleico aislado puede ser, p.ej., una molécula de ADN recombinante de cualquier longitud, a condición de que se retiren o estén ausentes las secuencias de ácido nucleico encontradas naturalmente que flanquean inmediatamente a la molécula de ADN recombinante en un genoma de origen natural. Los ácidos nucleicos aislados incluyen también moléculas de ácido nucleico de origen no natural. Los ácidos nucleicos divulgados en la presente memoria pueden comprender también fragmentos que codifican péptidos inmunogénico. Los ácidos nucleicos divulgados en la presente memoria pueden codificar polipéptidos completos, fragmentos peptídicos y péptidos variantes o de fusión.

Los ácidos nucleicos divulgados en la presente memoria pueden aislarse, al menos en parte, de secuencias de ácido nucleico presentes, por ejemplo, en una muestra biológica tal como sangre, suero, saliva o tejido de un individuo infectado. Los ácidos nucleicos pueden sintetizarse también en el laboratorio, por ejemplo usando un sintetizador automático. Puede usarse un procedimiento de amplificación tal como PCR para amplificar ácidos nucleicos, al menos en parte, a partir de ADN genómico o ADNc que codifica los polipéptidos.

Los ácidos nucleicos divulgados en la presente memoria pueden comprender secuencias de codificación de polipéptidos de origen natural o pueden codificar secuencias alteradas que no aparecen en la naturaleza. Si se desea, los ácidos nucleicos pueden clonarse en un vector de expresión que comprende elementos de control de la expresión incluyendo, por ejemplo, orígenes de replicación, promotores, potenciadores u otros elementos reguladores que impulsan la expresión de los polinucleótidos de la invención en células hospedadoras. Un vector de expresión puede ser, por ejemplo, un plásmido tal como pBR322, pUC o ColE1, o un vector adenovírico tal como un vector adenovírico de tipo 2 o de tipo 5. Opcionalmente, pueden usarse otros vectores incluyendo, pero sin limitación, vectores del virus Sindbis, virus de simio 40, alfavirus, vectores de poxvirus y vectores de citomegalovirus y retrovirus tales como virus de sarcoma de murino, virus de tumor mamario de ratón, virus de leucemia de murino de Moloney y virus de sarcoma de Rous. Pueden usarse también minicromosomas tales como MC y MC1, bacteriófagos, fagémicos, cromosomas artificiales de levadura, cromosomas artificiales bacterianos, partículas víricas, partículas de tipo vírico, cósmidos (plásmidos en que se han insertado sitios cos de fago lambda) y replicones (elementos genéticos que son capaces de replicación bajo su propio control en una célula).

Son bien conocidos en la materia los procedimientos para preparar polinucleótidos ligados operativamente con una secuencia de control de la expresión y expresarlos en una célula hospedadora. Véase, p.ej., la patente de EE.UU. nº

4.366.246. Un ácido nucleico está ligado operativamente cuando está dispuesto adyacente o cercano a uno o más elementos de control de la expresión, que dirigen la transcripción y/o traducción del polinucleótido.

5 Por tanto, por ejemplo, un péptido divulgado en la presente memoria puede producirse recombinantemente siguiendo técnicas de ingeniería genética convencionales. Para producir un péptido recombinante, se inserta un ácido nucleico que codifica el péptido en un sistema de expresión adecuado. Generalmente, se construye una molécula o vector recombinante en que la secuencia polinucleotídica que codifica el péptido seleccionado se liga operativamente con una secuencia de control de la expresión permitiendo la expresión del péptido. Son conocidos en la materia numerosos tipos de vectores de expresión apropiados incluyendo, p.ej., vectores que contienen sistemas de expresión bacterianos, víricos, de levadura, fúngicos, de insecto o mamífero. Son bien conocidos los procedimientos para obtener y usar dichos vectores de expresión. Para orientación en estas y otras técnicas de biología molecular usadas para composiciones o procedimientos de la invención, véanse, p.ej. Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", edición actual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York; Miller et al., "Genetic Engineering", 8: 277-298 (Plenum Press, edición actual), Wu et al., "Methods in Gene Biotechnology" (CRC Press, Nueva York, N.Y., edición actual), "Recombinant Gene Expression Protocols, in Methods in Molecular Biology", vol. 62, (Tuan, ed., Humana Press, Totowa, N.L, edición actual) y "Current Protocols in Molecular Biology", (Ausabel y col, Eds.,) John Wiley & Sons, NY (edición actual) y las referencias citadas en los mismos.

20 Por consiguiente se proporcionan también vectores que comprenden ácidos nucleicos de la invención y células hospedadoras que comprenden dichos vectores. En ciertas realizaciones, el vector es un vector lanzadera. En otras realizaciones, el vector es un vector de expresión (p.ej. un vector de expresión bacteriano o eucariótico). En ciertas realizaciones, la célula hospedadora es una célula bacteriana. En otras realizaciones, la célula hospedadora es una célula eucariótica.

25 Las células hospedadoras o líneas celulares adecuadas para la transfección de los ácidos nucleicos o vectores recombinante de la divulgación incluyen células bacterianas. Por ejemplo, son bien conocidas diversas cepas de *E. coli* (p.ej. HB101, MC1061) como células hospedadoras en el campo de la biotecnología. Pueden emplearse también en este procedimiento diversas cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y otros bacilos y similares. Como alternativa, puede expresarse un péptido en levadura, insecto, mamífero u otro tipo celular usando procedimientos convencionales.

35 Se proporciona también un procedimiento para producir un péptido o polipéptido recombinante que implica transfectar o transformar, p.ej. por medios convencionales tales como electroporación, una célula hospedadora con al menos un vector de expresión que contiene un polinucleótido de la divulgación bajo el control de una secuencia de control de la expresión (p.ej., una secuencia reguladora transcripcional). La célula hospedadora transfectada o transformada se cultiva entonces en condiciones que permitan la expresión del péptido o polipéptido. El péptido o polipéptido expresado se recupera, se aísla y opcionalmente se purifica de la célula (o del medio de cultivo, si se expresa de forma extracelular) mediante medios apropiados conocidos por el especialista en la materia, incluyendo cromatografía líquida tal como normal o en fase inversa, usando HPLC, FPLC y similares, cromatografía de afinidad tal como con ligandos inorgánicos o anticuerpos monoclonales, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de quelato metálico inmovilizado, electroforesis en gel y similares. Un especialista en la materia puede seleccionar las técnicas de aislamiento y purificación más apropiadas sin apartarse del alcance de esta invención. Un especialista en la materia puede determinar la pureza del péptido o polipéptido usando procedimientos estándares incluyendo, p.ej. electroforesis en gel de poli(acrilamida) (p.ej. PAGE-SDS), electroforesis capilar, cromatografía en columna (p.ej. cromatografía líquida de alta resolución) (HPLC) o análisis aminoácido aminoterminal.

Procedimientos

50 En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos de detección en una muestra de un anticuerpo contra un epítipo de un antígeno de *Ehrlichia*. Los procedimientos comprenden poner en contacto una muestra con una mezcla de péptidos aislados de la invención y detectar la formación de un complejo de anticuerpo-péptido que comprende dichos péptidos, donde la formación de dicho complejo es indicativa de la presencia de un anticuerpo contra un epítipo de un antígeno de *Ehrlichia* en dicha muestra. En ciertas realizaciones, el antígeno de *Ehrlichia* es de una especie de *Ehrlichia* infecciosa. En ciertas realizaciones, el antígeno de *Ehrlichia* es de una especie de *Ehrlichia* patogénica, tal como *Ehrlichia chaffeensis* o *Ehrlichia canis*. Pueden detectarse también usando los procedimientos de la invención otras especies de *Ehrlichia* que se han implicado en la ehrliquiosis monocítica, a condición de que induzcan anticuerpos que puedan reaccionar específicamente con una mezcla de péptidos aislados de la invención. Por tanto, ha de entenderse que el término "*Ehrlichia* patogénica" como se usa en la presente memoria, hace referencia a cualquier especie de *Ehrlichia* que cause ehrliquiosis monocítica.

65 Los procedimientos comprenden poner en contacto la muestra con una mezcla de 3, 4 o más (p.ej. 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 o más) péptidos diferentes de la invención. Los procedimientos divulgados en la presente memoria pueden comprender poner en contacto la muestra con una mezcla de uno o más péptidos de la invención y uno o más de otros péptidos (p.ej. un péptido de *Ehrlichia* o fragmento antigénico o epítipo del mismo, tal como un antígeno de superficie de *Ehrlichia* o una proteína OMP-1,

p38, p43, p120, p140, p153, p156, p200, gp19, gp36, gp47, gp200 o HGE-3).

5 Cada péptido de la mezcla es un péptido aislado (p.ej. sintético y/o purificado). En ciertas realizaciones, la mezcla de péptidos se enlaza con o se inmoviliza sobre un soporte sólido. En ciertas realizaciones, el soporte sólido es una perla (p.ej. una partícula coloidal, una nanopartícula, una perla de látex, etc.), una ruta de flujo de un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral (p.ej. una membrana porosa), una ruta de flujo de un rotor analítico, un tubo o un pocillo (p.ej. en una placa adecuada para un ensayo ELISA) o un sensor (p.ej. un sensor electroquímico, óptico u optoelectrónico).

10 En ciertas realizaciones, la etapa de detección comprende efectuar un ensayo ELISA. En otras realizaciones, la etapa de detección comprende efectuar un inmunoensayo de flujo lateral. En otras realizaciones, la etapa de detección comprende efectuar un ensayo de aglutinación (p.ej. un ensayo de hemaglutinación o aglutinación de partícula/perla). En otras realizaciones, la etapa de detección comprende centrifugar la muestra en un rotor analítico. En aún otras realizaciones, la etapa de detección comprende analizar la muestra con un sensor electroquímico, óptico u optoelectrónico.

20 Hay una serie de ensayos convencionales diferentes para detectar la formación de un complejo de anticuerpo-péptido. Por ejemplo, la etapa de detección puede comprender efectuar un ensayo ELISA, efectuar un inmunoensayo de flujo lateral, efectuar un ensayo de aglutinación, analizar la muestra en un rotor analítico o analizar la muestra con un sensor electroquímico, óptico u optoelectrónico. Estos diferentes ensayos se describen anteriormente y/o son bien conocidos por los especialistas en la materia.

25 En una realización, los procedimientos implican detectar la presencia de anticuerpos de origen natural contra un antígeno de *Ehrlichia* (p.ej., el antígeno de una *Ehrlichia* patogénica, tal como *E. chaffeensis* o *E. canis*) que se producen por el sistema inmunitario del sujeto infectado en sus fluidos biológicos o tejidos, y que son capaces de unirse específicamente a un péptido de la invención o a combinaciones de un péptido de la invención y, opcionalmente, uno o más polipéptidos o péptidos antigénicos adicionales adecuados.

30 Los procedimientos de inmunoensayo adecuados incluyen típicamente: recibir u obtener (p.ej. de un paciente) una muestra de fluido corporal o tejido que es probable que contenga anticuerpos; poner en contacto (p.ej. incubar o hacer reaccionar) una muestra para ensayar con un péptido de la invención en condiciones efectivas para la formación de un complejo de péptido-anticuerpo específico (p.ej., para la unión específica del péptido al anticuerpo) y ensayar en la muestra puesta en contacto (reaccionada) la presencia de una reacción de anticuerpo-péptido (p.ej., determinar la cantidad de complejo de anticuerpo-péptido). La presencia de una cantidad elevada de complejo de anticuerpo-péptido indica que el sujeto se ha expuesto a e infectado con una especie de *Ehrlichia* infecciosa. Un péptido, incluyendo una forma modificada del mismo, que se "une específicamente" a (p.ej. "es específico de" o se une "preferencialmente a") un anticuerpo contra un antígeno de *Ehrlichia* interacciona con el anticuerpo, o forma o experimenta una asociación física con él, en una medida y durante un tiempo suficiente para permitir la detección del anticuerpo. Se entiende por "específicamente" o "preferencialmente" que el péptido tiene una mayor afinidad (concretamente un mayor grado de selectividad) por dicho anticuerpo que por otros anticuerpos de una muestra. Por ejemplo, el péptido puede tener una afinidad por el anticuerpo de al menos aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces o más que por otros anticuerpos de la muestra. Dicha afinidad o grado de especificidad puede determinarse mediante una variedad de procedimientos rutinarios incluyendo, p.ej., estudios de unión competitiva. En un ensayo ELISA, se define una respuesta positiva como un valor 2 o 3 desviaciones estándares mayor que el valor medio de un grupo de controles sanos. En algunas realizaciones, se requiere un ensayo de segundo nivel para proporcionar un serodiagnóstico inequívoco de ehrlichiosis monocítica.

50 Frases tales como "muestra que contiene un anticuerpo" o "detectar un anticuerpo en una muestra" no pretenden excluir las muestras o determinaciones (p.ej. intentos de detección) donde no está contenido ni es detectado anticuerpo. En sentido general, esta invención implica ensayos para determinar si un anticuerpo producido en respuesta a la infección con una *Ehrlichia* infecciosa está presente en una muestra, independientemente de si se detecta o no.

55 Las condiciones para hacer reaccionar péptidos y anticuerpos de modo que reaccionen específicamente son bien conocidas por los especialistas en la materia. Véase, p.ej., "Current Protocols in Immunology" (Coligan et al., editores, John Wiley & Sons, Inc).

60 Los procedimientos divulgados en la presente memoria comprenden recibir u obtener una muestra de fluido corporal o tejido que es probable que contenga anticuerpos de un sujeto. Los anticuerpos pueden ser, p.ej. de tipo IgG, IgE, IgD, IgM o IgA. Generalmente, se detectan anticuerpos de IgM y/o IgA, p.ej. para detección en etapas tempranas de infección. Los anticuerpos de IgG pueden detectarse cuando se usan algunos de los péptidos adicionales discutidos anteriormente en el procedimiento (concretamente péptidos para la detección de proteínas de flagelo). La muestra es preferiblemente fácil de obtener y puede ser sangre completa, plasma o suero derivado de una muestra de sangre venosa o incluso de una punción digital. Es conocido que los tejidos de otras partes del cuerpo u otros fluidos corporales, tales como líquido cefalorraquídeo (LCR), saliva, secreciones gástricas, moco, orina, etc. contienen anticuerpos y pueden usarse como fuente de la muestra.

Una vez se dejan reaccionar antígeno peptídico y anticuerpo de muestra en un medio adecuado, se efectúa un ensayo para determinar la presencia o ausencia de una reacción de anticuerpo-péptido. Entre los muchos tipos de ensayos adecuados, que resultarán evidentes para un especialista, están los ensayos de inmunoprecipitación y aglutinación.

5 En ciertas realizaciones, el ensayo comprende: inmovilizar el anticuerpo o anticuerpos de la muestra, añadir un péptido divulgado en la presente memoria y detectar el grado de unión del anticuerpo al péptido, p.ej. marcando el péptido o añadiendo una sustancia marcada, tal como un ligando de unión marcado (p.ej., estreptavidina-HRP o complejo de estreptavidina-oro coloidal) o un anticuerpo marcado que reconoce específicamente el péptido. Véase, p.ej., la Figura 1. En otras realizaciones, el ensayo comprende: inmovilizar un péptido divulgado en la presente memoria, añadir la muestra que contiene anticuerpos y detectar la cantidad de anticuerpo unido al péptido, p.ej. añadiendo otro péptido divulgado en la presente memoria conjugado directa o indirectamente con un marcaje (p.ej. complejo de oro coloidal, marcaje fluorescente, enzima (p.ej. peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina)) o añadiendo una sustancia marcada tal como un ligando de unión o un anticuerpo marcado que reconoce específicamente los anticuerpos de la muestra (p.ej., anticuerpos anti-IgG humanos, anticuerpos anti-IgM humanos, anticuerpos anti-IgG de perro, anticuerpos anti-IgM de perro, proteína A, proteína G, proteína L o combinaciones de los mismos, etc.). Véase, p.ej., la Figura 3. En aún otras realizaciones, el ensayo comprende: hacer reaccionar el péptido y la muestra que contiene anticuerpos sin inmovilizar ninguno de los reactantes y detectar entonces la cantidad de complejos de anticuerpo y péptido, p.ej. marcando el péptido o añadiendo una sustancia marcada, tal como un ligando de unión marcado (p.ej. estreptavidina-HRP o complejo de estreptavidina-oro coloidal) o un anticuerpo marcado que reconoce específicamente el péptido.

La inmovilización de un péptido divulgado en la presente memoria puede ser covalente o no covalente, y la inmovilización no covalente puede ser no específica (p.ej. unión no específica a una superficie de poliestireno, p.ej. en un pocillo de microvaloración). La unión específica o semiespecífica a un vehículo, soporte o superficie sólido o semisólido puede conseguirse teniendo el péptido asociado al mismo un resto que posibilite su unión covalente o no covalente con el vehículo, soporte o superficie sólido o semisólido. Por ejemplo, el resto puede tener afinidad por un componente enlazado con el vehículo, soporte o superficie. En este caso, el resto puede ser, p.ej., una biotina o grupo biotínico o un análogo de los mismos unido a un grupo aminoacídico del péptido, tal como ácido 6-aminohexanoico, y el componente es entonces avidina, estreptavidina, neutravidina o un análogo de los mismos. Es una alternativa una situación en que el resto tiene la secuencia aminoacídica His-His-His-His-His-His (SEQ ID NO: 95) y el vehículo comprende un derivado de ácido nitriloacético (NTA) cargado con iones Ni^{++} o Co^{++} . Los vehículos, soportes y superficies adecuados incluyen, pero sin limitación, perlas (p.ej. perlas magnéticas, partículas o nanopartículas coloidales, tales como oro coloidal, o partículas o nanopartículas que comprenden sílice, látex, poliestireno, policarbonato o PDVF), látex de copolímeros tales como estirenodivinilbenceno, estirenodivinilbenceno hidroxilado, poliestireno, poliestireno carboxilado, perlas de negro de carbono, vidrio no activado o activado con poliestireno o poli(cloruro de vinilo), vidrio magnético poroso activado con epóxido, partículas de gelatina o polisacárido u otras proteínas, glóbulos rojos, anticuerpos monoclonales o policlonales o fragmentos Fab de dichos anticuerpos.

Los protocolos para inmunoensayos que usan antígenos para la detección de anticuerpos específicos son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, puede usarse un ensayo de tipo sándwich convencional, o puede usarse un formato de ensayo competitivo convencional. Para una discusión de algunos tipos adecuados de ensayos, véase "Current Protocols in Immunology" (*supra*). En ciertas realizaciones, se inmoviliza un péptido de la invención sobre una superficie o vehículo sólido o semisólido mediante unión covalente o no covalente, antes o después de la adición de la muestra que contiene anticuerpo.

Los dispositivos para efectuar ensayos de unión específica, especialmente inmunoensayos, son conocidos y pueden adaptarse fácilmente para uso en los presentes procedimientos. Los ensayos en fase sólida, en general, son más fáciles de efectuar que los procedimientos de ensayo heterogéneos, que requieren una etapa de separación tal como precipitación, centrifugación, filtración, cromatografía o magnetismo, porque la separación de los reactivos es más rápida y más sencilla. Los dispositivos de ensayo en fase sólida incluyen placas de microvaloración, dispositivos de ensayo de flujo continuo (p.ej. dispositivos de inmunoensayo de flujo lateral), tiras reactivas y dispositivos de inmunoensayo inmunocapilar o inmunocromatográfico.

En realizaciones de la invención, la superficie o vehículo sólido o semisólido es el suelo o la pared de un pocillo de microvaloración, una superficie de filtro o membrana (p.ej., una membrana de nitrocelulosa o una membrana de PVDF (poli(fluoruro de vinilideno)), tal como una membrana Immobilon™), una fibra hueca, un medio cromatográfico en perlas (p.ej. un gel de agarosa o poli(acrilamida)), una perla magnética, una matriz de celulosa fibrosa, una matriz de HPLC, una matriz de FPLC, una sustancia que tiene moléculas de un tamaño tal que las moléculas con el péptido unido a las mismas, cuando se disuelven o dispersan en una fase líquida, puedan retenerse mediante un filtro, una sustancia capaz de formar micelas o de participar en la formación de micelas al permitir el cambio o intercambio de una fase líquida sin arrastrar las micelas, un polímero hidrosoluble o cualquier otro vehículo, soporte o superficie adecuada.

En algunas realizaciones de la invención, el péptido se proporciona con un marcaje adecuado que posibilita la

detección. Pueden usarse marcajes convencionales que pueden, solos o concertados con otras composiciones o compuestos, proporcionar una señal detectable. Los marcajes adecuados incluyen, pero sin limitación, enzimas (p.ej. HRP, beta-galactosidasa, etc.), marcajes fluorescentes, marcajes radiactivos y marcajes conjugados con metal (p.ej. marcajes conjugados con oro coloidal). Los procedimientos de detección adecuados incluyen, p.ej. la detección de un agente que está marcado, directa o indirectamente, con un ensayo colorimétrico, p.ej., para la detección de HRP o actividad de beta-galactosidasa), la inspección visual usando microscopia óptica, microscopia por inmunofluorescencia, incluyendo microscopia confocal, o citometría de flujo (FACS), autorradiografía (p.ej. para la detección de un agente marcado con radiactividad), microscopia electrónica, inmunotinción, fraccionamiento subcelular o similares. En una realización, se incorpora un elemento radiactivo (p.ej. un aminoácido radiactivo) directamente a una cadena peptídica; en otra realización, se asocia un marcaje fluorescente con un péptido mediante interacción de biotina/avidina, asociación con un anticuerpo conjugado con fluoresceína o similar. En una realización, se añade a la mezcla un ligando de unión específico detectable para el anticuerpo. Por ejemplo, el ligando de unión puede ser un anticuerpo secundario detectable u otro agente de unión (p.ej., proteína A, proteína G, proteína L) que se une al primer anticuerpo. Este anticuerpo secundario u otro agente de unión puede marcarse, p.ej., con un marcaje radiactivo, enzimático, fluorescente, luminiscente u otro detectable, tal como un sistema de avidina/biotina. En otra realización, el ligando de unión es un péptido de la invención que puede conjugarse directa o indirectamente (p.ej. mediante interacción de biotina/avidina) con una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. En dichas realizaciones, la señal detectable se produce añadiendo un sustrato de la enzima que produce una señal detectable, tal como un sustrato cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente.

Un "sistema de detección" para detectar péptido unido, como se usa en la presente memoria, puede comprender un ligando de unión detectable, tal como un anticuerpo específico del péptido. En una realización, el ligando de unión se marca directamente. En otra realización, el ligando de unión se enlaza con un reactivo generador de señal, tal como una enzima que, en presencia de un sustrato adecuado, puede producir una señal detectable. Puede acompañar opcionalmente al sistema de detección una superficie para inmovilizar el péptido.

En realizaciones de la invención, el procedimiento de detección comprende inspeccionar visualmente en el complejo de anticuerpo-péptido un cambio de color, o inspeccionar en el complejo de anticuerpo-péptido un cambio fisicoquímico. Los cambios fisicoquímicos pueden aparecer con reacciones de oxidación u otras reacciones químicas. Pueden detectarse visualmente, usando un espectrofotómetro o similares.

Es un formato de ensayo particularmente útil el formato de inmunoensayo de flujo lateral. Los anticuerpos contra inmunoglobulinas humanas o animales (p.ej., perro, ratón, venado, etc.) o proteínas Staph A, G o L pueden marcarse con un generador de señal o indicador (p.ej. oro coloidal) que se seca y se dispone sobre una almohadilla de fibra de vidrio (almohadilla de aplicación de muestra o almohadilla de conjugado). Se inmoviliza el péptido de diagnóstico sobre una membrana tal como nitrocelulosa o membrana de PVDF (poli(fluoruro de vinilideno)) (p.ej., membrana Immobilon™). Cuando se aplica una solución de muestra (sangre, suero, etc.) a la almohadilla de aplicación de muestra (o fluye a través de la almohadilla de conjugado), se disuelve el indicador marcado, que se une entonces a todos los anticuerpos de la muestra. Se transportan entonces los complejos resultantes a la siguiente membrana (PVDF o nitrocelulosa que contiene el péptido de diagnóstico) mediante acción capilar. Si están presentes anticuerpos contra el péptido de diagnóstico, se unen al péptido de diagnóstico extendido sobre la membrana, generando así una señal (por ejemplo una banda que puede verse o visualizarse). Puede usarse para producir la señal de control un anticuerpo adicional específico del anticuerpo marcado o un segundo anticuerpo marcado. Como variación de este formato de ensayo, la muestra puede aplicarse a la almohadilla de aplicación de muestra de manera que permita que los anticuerpos de la muestra se desplacen y se unan a los péptidos de la tira de diagnóstico, y puede añadirse una segunda solución "reveladora" a la almohadilla de aplicación de muestra, donde la solución reveladora contiene indicador marcado (o, p.ej., se solubiliza el indicador marcado presente en la almohadilla de aplicación de muestra o almohadilla de conjugado). La solución reveladora porta entonces, por acción capilar, el indicador marcado a la tira de diagnóstico, donde el indicador marcado puede unirse a cualquier anticuerpo de muestra unido a los péptidos localizados en la tira de diagnóstico.

Un formato alternativo al inmunoensayo de flujo lateral comprende conjugar los péptidos o composiciones divulgados en la presente memoria con un ligando (p.ej. biotina) y complejar con receptor de ligando marcado (p.ej. estreptavidina-oro coloidal). Los complejos peptídicos marcados pueden disponerse en la almohadilla de aplicación de muestra o almohadilla de conjugado. Los anticuerpos anti-IgG/IgM humana o anti-IgG/IgM de animal (p.ej. perro, ratón, venado) u otros péptidos divulgados en la presente memoria se inmovilizan sobre una membrana, tal como de nitrocelulosa o PVDF, en un sitio de prueba (p.ej. una línea de prueba). Cuando se añade muestra a la almohadilla de aplicación de muestra, los anticuerpos de la muestra reaccionan con los complejos peptídicos marcados de tal modo que los anticuerpos que se unen a péptidos de la divulgación se marquen indirectamente. Se transportan entonces los anticuerpos de la muestra a la siguiente membrana (PVDF o nitrocelulosa que contiene el péptido de diagnóstico) mediante acción capilar y se unen a los anticuerpos anti-IgG/IgM humana o anti-IgG/IgM de animales (o proteína A, proteína G, proteína L o combinaciones de las mismas) o péptidos inmovilizados divulgados en la presente memoria. Si algunos de los anticuerpos de muestra se unen a los péptidos marcados divulgados en la presente memoria, puede verse o visualizarse el marcaje asociado a los péptidos en el sitio de prueba. Se muestra una realización de este tipo de dispositivo de flujo lateral en la Figura 2. Se muestra otra realización de este tipo de dispositivo de flujo lateral en la Figura 3, en que se usan los péptidos divulgados en la presente memoria tanto como

agente de captura inmovilizado en un sitio de prueba como complejo marcado soluble para reaccionar con anticuerpos de una muestra. Los controles adecuados para este ensayo pueden incluir, p.ej., conjugado de IgY de pollo-oro coloidal localizado en la almohadilla de aplicación de muestra o almohadilla de conjugado, y anticuerpo anti-IgY de pollo inmovilizado en un sitio de control localizado proximal al sitio de ensayo. Este formato puede modificarse también para tener una solución "reveladora". Por ejemplo, la solución reveladora podría contener (o solubilizar) el receptor de ligando marcado.

Es otro ensayo para el cribado de productos sanguíneos u otros fluidos fisiológicos o biológicos un ensayo de inmunosorción ligado a enzima, concretamente un ELISA. Típicamente, se adsorben en un ELISA péptidos aislados de la invención sobre la superficie de un pocillo de microvaloración directamente o mediante una matriz de captura (p.ej. un anticuerpo). Se bloquean entonces los sitios de unión a proteína no específicos residuales sobre la superficie con un agente apropiado, tal como seroalbúmina bovina (BSA), suero de cabra normal termoinactivado (NGS) o BLOTTO (una solución tamponada de leche desnatada desecada que contiene también un conservante, sales y un agente antiespumante). Se incuba entonces el pocillo con una muestra biológica sospechosa de contener anticuerpo específico anti-*Ehrlichia* (p.ej., anti-*E. chaffeensis* o anti-*E. canis*). La muestra puede aplicarse pura o, más a menudo, puede diluirse, habitualmente en una solución tamponada que contiene una pequeña cantidad (0,1-5,0 % en peso) de proteína tal como BSA, NGS o BLOTTO. Después de incubar durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que ocurra la unión específica, se lava el pocillo para retirar la proteína no unida y se incuba entonces con una concentración óptima de un anticuerpo anti-inmunoglobulina apropiado (p.ej. para sujetos humanos, una inmunoglobulina anti-humana (α -Hulg) de otro animal tal como perro, ratón, vaca, etc.) u otro péptido de la invención que esté conjugado con una enzima u otro marcaje mediante procedimientos estándares y se disuelve en tampón de bloqueo. El marcaje puede elegirse de una variedad de enzimas, incluyendo peroxidasa de rábano picante (HRP), beta-galactosidasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, etc. Se deja suficiente tiempo para que ocurra de nuevo la unión específica, se lava entonces de nuevo el pocillo para retirar el conjugado no unido y se añade un sustrato adecuado para la enzima. Se deja revelar el color y se determina la densidad óptica de los contenidos del pocillo visual o instrumentalmente (medido a una longitud de onda apropiada). El valor de corte de DO puede definirse como la DO media + 3 desviaciones estándares (DE) de al menos 50 muestras de suero recogidas de individuos de una zona donde la ehrlichiosis no sea endémica, o mediante otras de dichas definiciones convencionales. En el caso de un ensayo muy específico, puede usarse DO+2 DE como valor de corte.

En una realización de ELISA, se inmoviliza un péptido de la invención sobre una superficie, tal como una placa ELISA de 96 pocillos o fase sólida equivalente que está recubierta con estreptavidina o un compuesto de unión a biotina equivalente, tal como avidina o neutravidina, a una concentración óptima en un tampón de recubrimiento alcalino y se incuba a 4 °C durante una noche. Después de un número adecuado de lavados con tampones de lavado estándares, se aplica a cada pocillo una concentración óptima de una forma biotinilada de un péptido o composición de la invención, disuelta en un tampón de bloqueo convencional. Se añade entonces una muestra y el ensayo prosigue como anteriormente. Las condiciones para efectuar ensayos ELISA son bien conocidas en la materia.

Un formato alternativo para el ensayo ELISA presenta el péptido o péptidos de la invención enlazados (p.ej. fusionados) con una enzima apropiada tal como HRP. Las etapas para llevar a cabo dicho ELISA incluyen: recubrir los pocillos de una placa con IgG/IgM anti-perro o anti-humana; incubar las muestras sospechosas de contener anticuerpos contra el péptido de la invención con las IgG/IgM inmovilizadas anti-especies; retirar la muestra no reaccionada y lavar los pocillos con un tampón de lavado adecuado; aplicar péptido acoplado con enzima (p.ej. acoplado con HRP) de la invención y dejarlo reaccionar con cualquier anticuerpo anti-*Ehrlichia* capturado y visualizar el péptido acoplado con enzima aplicando un sustrato enzimático apropiado (p.ej. TMB).

En otra realización, los procedimientos comprenden un ensayo de aglutinación. Por ejemplo, en ciertas realizaciones se conjugan partículas coloidales (p.ej. oro coloidal, etc.) o perlas de látex con péptidos de la invención. Posteriormente, se incuba el fluido biológico con el conjugado de perla/péptido, formando así una mezcla de reacción. Se analiza entonces la mezcla de reacción para determinar la presencia de anticuerpos. En ciertas realizaciones, los ensayos de aglutinación comprenden el uso de una segunda población de partículas tales como partículas coloidales (p.ej. oro coloidal, etc.) o perlas de látex conjugadas con (1) anticuerpos específicos de los péptidos de la invención, en el caso de un ensayo competitivo, o (2) anticuerpos capaces de detectar anticuerpos de la muestra (p.ej., anticuerpos anti-IgG o IgM humanos, anticuerpos anti-IgG o IgM de perro, etc.), en el caso de un ensayo de tipo sándwich. Los procedimientos de aglutinación adecuados pueden comprender la centrifugación como medio de valoración de la extensión de la aglutinación.

En aún otra realización, los péptidos de la invención se electrotransfieren o transfieren puntualmente a papel de nitrocelulosa. Posteriormente, se incuba una muestra tal como un fluido biológico (p.ej. suero o plasma) con el antígeno transferido y se deja unir el fluido biológico al antígeno o antígenos. El anticuerpo unido puede detectarse entonces, p.ej., mediante procedimientos inmunoenzimáticos estándares o mediante visualización usando nanopartículas coloidales acopladas con anticuerpos secundarios u otros agentes de unión a anticuerpo, tales como proteína A, proteína G, proteína L o combinaciones de los mismos.

Debería entenderse por un especialista en la materia que puede designarse cualquier número de formatos de

ensayo de proteína convencionales, particularmente formatos de inmunoensayo, para utilizar los péptidos aislados de esta invención para la detección de anticuerpos de *Ehrlichia* e infección por *Ehrlichia* patogénica (p.ej., *E. chaffeensis* o *E. canis*) en un sujeto. Esta invención no está por tanto limitada por la selección del formato de ensayo particular, y se cree que engloba formatos de ensayos que son conocidos por los especialistas en la materia.

En ciertas realizaciones, la muestra usada en los procedimientos es un fluido corporal, tal como sangre, suero, líquido cefalorraquídeo, orina o saliva. En otras realizaciones, la muestra es un tejido (p.ej. un homogeneizado de tejido) o un lisado celular. En ciertas realizaciones, la muestra es de un animal silvestre (p.ej. un venado o roedor tal como un ratón, ardilla listada, ardilla, etc.). En otras realizaciones, la muestra es de un animal de laboratorio (p.ej. un ratón, rata, conejillo de Indias, conejo, mono, primate, etc.). En otras realizaciones, la muestra es de un animal domesticado o salvaje (p.ej. un perro, gato o caballo). En aún otras realizaciones, la muestra es de un ser humano.

Gran parte de la discusión precedente está dirigida a la detección de anticuerpos contra *Ehrlichia* patogénica. Sin embargo, ha de entenderse que la discusión se aplica también a la detección de linfocitos T cebados, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se espera que se genere una respuesta inmunitaria mediada por célula (p.ej. una respuesta auxiliar de linfocitos T), puesto que se produce IgG. Se espera por lo tanto que sea posible determinar la reactividad inmunológica entre los linfocitos T cebados y un péptido divulgado en la presente memoria. Esto puede hacerse *in vitro* incubando linfocitos T aislados de un sujeto con un péptido divulgado en la presente memoria y midiendo la inmunorreactividad, p.ej. midiendo la proliferación posterior de linfocitos T o midiendo la liberación de citocinas por los linfocitos T tales como IFN- γ . Estos procedimientos son bien conocidos en la materia.

Cuando se lleva a cabo un procedimiento proporcionado en la presente memoria *in vivo*, puede usarse cualquiera de una variedad de ensayos convencionales. Por ejemplo, puede efectuarse un ensayo en forma de una prueba cutánea, p.ej. mediante inyección intradérmica en el sujeto de un péptido de la divulgación. Una reacción cutánea positiva en la localización de la inyección indica que el sujeto se ha expuesto a e infectado con una *Ehrlichia* patogénica capaz de causar ehrliquiosis monocítica, y una respuesta cutánea negativa en la localización de la inyección indica que el sujeto no se ha expuesto/infectado. Esta u otras pruebas *in vivo* se basan en la detección de una respuesta de linfocitos T en el sujeto.

La invención proporciona procedimientos de diagnóstico de ehrliquiosis monocítica en una muestra de un sujeto, como se precisa en las reivindicaciones. El sujeto puede ser un sujeto sospechoso de tener anticuerpos contra un agente causante de ehrliquiosis monocítica. El procedimiento de diagnóstico es útil para diagnosticar sujetos que exhiben síntomas clínicos de ehrliquiosis monocítica.

Los procedimientos comprenden poner en contacto una muestra del sujeto con una mezcla de péptidos aislados de la invención, y detectar la formación de un complejo de anticuerpo-péptido que comprende uno o más de dichos péptidos, donde la formación de dicho complejo es indicativa de que el sujeto tiene la enfermedad ehrliquiosis. Los procedimientos comprenden poner en contacto la muestra con una mezcla de 3, 4 o más (p.ej., 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 o más) péptidos aislados diferentes de la invención. Los procedimientos divulgados en la presente memoria pueden comprender poner en contacto la muestra con una mezcla de uno o más péptidos divulgados en la presente memoria y uno o más de otros péptidos (p.ej. un péptido de *Ehrlichia*, o fragmento antigénico o epitopo del mismo, tal como de una proteína de superficie de *Ehrlichia* o una proteína OMP-1, p38, p43, p120, p140, p153, p156, p200, gp19, gp36, gp47, gp200 o HGE-3).

Cada péptido de la mezcla es un péptido aislado (p.ej. sintético y/o purificado). En ciertas realizaciones, la mezcla de diferentes péptidos se enlaza con o inmoviliza sobre un sustrato (p.ej. un soporte sólido o semisólido). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el sustrato es una perla (p.ej. una partícula o nanopartícula coloidal o de otro tipo), una ruta de flujo en un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral (p.ej. una membrana porosa), una ruta de flujo en un rotor analítico o un tubo o pocillo (p.ej. en una placa adecuada para ensayo ELISA).

Hay una serie de diferentes ensayos convencionales para detectar la formación de un complejo de anticuerpo-péptido. Por ejemplo, la etapa de detección puede comprender efectuar un ensayo ELISA, efectuar un inmunoensayo de flujo lateral, efectuar un ensayo de aglutinación, analizar la muestra en un rotor analítico o analizar la muestra con un sensor electroquímico, óptico u optoelectrónico. Estos diferentes ensayos se describen anteriormente y/o son bien conocidos por los especialistas en la materia.

En ciertas realizaciones, la muestra es un fluido corporal, tal como sangre, suero, líquido cefalorraquídeo, orina o saliva. En otras realizaciones, la muestra es un tejido (p.ej. un homogeneizado de tejido) o un lisado celular. En ciertas realizaciones, el sujeto es un animal silvestre (p.ej. un venado o roedor tal como un ratón, ardilla rayada, ardilla, etc.). En otras realizaciones, el sujeto es un animal de laboratorio (p.ej. un ratón, rata, conejillo de Indias, conejo, mono, primate, etc.). En otras realizaciones, el sujeto es un animal domesticado o salvaje (p.ej. un perro, gato o caballo). En aún otras realizaciones, el sujeto es un ser humano.

Kits

En aún otro aspecto, la invención proporciona kits como se precisan en las reivindicaciones adjuntas. Los kits comprenden 3, 4 o más péptidos aislados diferentes de la invención. Los péptidos comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 59. Los kits divulgados en la presente memoria pueden comprender péptidos que comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 92. En ciertas realizaciones, los péptidos están enlazados con o inmovilizados sobre un soporte sólido. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el soporte sólido es una perla (p.ej. una partícula o nanopartícula coloidal), una ruta de flujo en un dispositivo de inmunoensayo de flujo, una ruta de flujo en un rotor analítico o un tubo o pocillo (p.ej. en una placa).

Pueden proporcionarse también en los kits de la invención reactivos para tipos particulares de ensayos. Por tanto, los kits pueden incluir una población de perlas (p.ej., adecuadas para un ensayo de aglutinación o un ensayo de flujo lateral) o una placa (p.ej. una placa adecuada para un ensayo ELISA). En otras realizaciones, los kits comprenden un dispositivo tal como un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral, un rotor analítico o un sensor electroquímico, óptico u optoelectrónico. La población de perlas, placa y dispositivos son útiles para efectuar un inmunoensayo. Por ejemplo, pueden ser útiles para detectar la formación de un complejo de anticuerpo-péptido que comprende un anticuerpo de una muestra y un péptido de la invención. En ciertas realizaciones, un péptido, una mezcla de péptidos diferentes de la invención o una composición peptídica de la invención se enlazan con o se inmovilizan sobre las perlas, la placa o el dispositivo.

Además, los kits pueden incluir diversos diluyentes y tampones, conjugados marcados u otros agentes para la detección de antígenos o anticuerpos unidos específicamente, y otros reactivos generadores de señal tales como sustratos enzimáticos, cofactores y cromógenos. Pueden determinarse fácilmente por un especialista en la materia otros componentes de un kit. Dichos componentes pueden incluir reactivos de recubrimiento, anticuerpos de captura policlonales o monoclonales específicos de un péptido de la invención o un cóctel de dos o más de los anticuerpos, extractos purificados o semipurificados de estos antígenos como patrones, anticuerpos detectores de anticuerpo monoclonal, un anticuerpo anti-ratón, anti-perro, anti-pollo o anti-humano con molécula indicadora conjugada con el mismo, gráficas indicadoras para comparaciones colorimétricas, guantes desechables, instrucciones de descontaminación, varillas o recipientes de aplicación, vasos preparadores de mezcla, etc. En una realización, un kit comprende tampones u otros reactivos apropiados para constituir un medio de reacción que permita la formación de un complejo de péptido-anticuerpo.

Dichos kits proporcionan un modo conveniente y eficiente para que un laboratorio clínico diagnostique infección por *Ehrlichia* patogénica, tal como *E. chaffeensis* o *E. canis*. Por tanto, en ciertas realizaciones, los kits comprenden además instrucciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los kits comprenden instrucciones que indican cómo usar un péptido de la invención para detectar un anticuerpo contra un antígeno de *Ehrlichia* o para diagnosticar ehrliquisis monocítica. En ciertas realizaciones, los kits comprenden instrucciones que indican cómo usar una población de perlas, una placa o un dispositivo (p.ej., que comprende un péptido o una mezcla de péptidos diferentes de la invención) para detectar un anticuerpo contra un antígeno de *Ehrlichia* o para diagnosticar ehrliquisis monocítica.

Los péptidos, composiciones y dispositivos que comprenden los péptidos, kits y procedimientos divulgados de la presente memoria ofrecen una serie de ventajas. Por ejemplo, permiten una detección sencilla, barata, rápida, sensible y exacta de la ehrliquisis monocítica y evitan la reactividad serológica cruzada con otras afecciones con síntomas similares. Esto permite un diagnóstico exacto. Además, una prueba de diagnóstico de la invención (p.ej. un ensayo ELISA, inmunoensayo de flujo lateral o ensayo de aglutinación) es útil en muestras de suero que contienen anticuerpos anti-OMP-1 u otros anticuerpos producidos en respuesta a una vacuna basada en las proteínas de superficie externa de *Ehrlichia*.

Los siguientes ejemplos ilustran diversos aspectos de la invención. Debería entenderse, por supuesto, que los ejemplos son meramente ilustrativos de solo ciertas realizaciones de la invención y no constituyen limitaciones sobre el alcance de la invención.

EJEMPLOS**Ejemplo 1**

Se efectuaron pruebas de tira reactiva usando muestras de suero que se conocía que eran positivas o negativas de *Ehrlichia*. Las tiras reactivas consistían en nitrocelulosa HF180 de 2 mm ancho con una mecha superior CF6 de 17 mm y una línea de captura que contiene péptidos AIRM-2 enlazados con la membrana de nitrocelulosa. Los péptidos AIRM-2 eran una mezcla de péptidos biotinilados que tiene cada uno una secuencia de SEQ ID NO: 1, y se enlazaban con la membrana a través de estreptavidina. Se bloquearon las mitades inferiores de las tiras reactivas con una solución de PBS, 1 % de BSA, 1 % de Triton X-100, pH 7,4.

Inicialmente, se varió la cantidad de péptidos AIRM-2 enlazados con una tira reactiva entre 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml y 1,0 mg/ml, y se varió además la relación de péptido:estreptavidina entre 1:1, 1:4 y 1:8 para cada una de las

concentraciones peptídicas.

La prueba consistía en: disponer cada tira reactiva en un pocillo que contenía 40 µl de TBS y dejar que el pocillo se vaciara (etapa de lavado); disponer 1 µl de muestra puntual sobre la mitad inferior bloqueada de cada tira reactiva; disponer cada tira reactiva en un pocillo que contiene 40 µl de conjugado y dejar que el pocillo se vaciara y leer cualquier señal presente en la línea de captura de cada tira reactiva. El conjugado consistía en IgG de conejo anti-perro conjugada con oro a DO1 u DO2.

Se muestran en las Tablas 1 y 2 los resultados de la muestra positiva de *Ehrlichia* (R09266-007 (BH19))

Tabla 1

Conj. DO1 + AIRM2 0,1 mg/ml		Conj. DO1 + AIRM-2 0,5 mg/ml		Conj. DO1 + AIRM-2 1,0 mg/ml	
Relación SA	(Op1)	Relación SA	(Op1)	Relación SA	(Op1)
1:1	8	1:1	9	1:1	11
1:4	9	1:4	11	1:4	11
1:8	9	1:8	11	1:8	11

Tabla 2

Conj. DO2 + AIRM2 0,1 mg/ml		Conj. DO2 + AIRM-2 0,5 mg/ml		Conj. DO2 + AIRM-2 1,0 mg/ml	
Relación SA	(Op1)	Relación SA	(Op1)	Relación SA	(Op1)
1:1	10	1:1	8	1:1	11
1:4	4	1:4	11	1:4	11
1:8	11	1:8	11	1:8	5

Los correspondientes resultados para la muestra negativa de *Ehrlichia* (R09266-008) eran todos 0. Aunque todos los resultados con la muestra positiva de *Ehrlichia* mostrados en las Tablas 1 y 2 producían una señal positiva en la línea de captura, los péptidos AIRM-2 0,5 mg/ml con una relación 1:4 o 1:8 de péptido:estreptavidina parecían proporcionar las condiciones de captura óptimas para ensayos adicionales.

Ejemplo 2

Efectuando pruebas de tira reactiva según el procedimiento del ejemplo 1 con péptidos AIRM-2 0,5 mg/ml, una relación de péptido:estreptavidina de 1:4 y conjugado DO1, se ensayó un panel de muestras séricas positivas y negativas de *Ehrlichia*. Se muestran los resultados en la Tabla 3.

Tabla 3

Muestra	Tira reactiva 1 (Op1)	Tira reactiva 2 (Op1)	Media	D.E.
BH1	10	10	10	0
BH2	10	10	10	0
BH5	10	10	10	0
BH9	10	10	10	0
BH15	10	10	10	0
BH16	10	10	10	0
BH17	10	10	10	0
BH18	10	10	10	0
BH19	10	10	10	0
Neg: R09266-008	0	0	0	0
Neg: Muestra de Borrelia 2	0	0	0	0
Neg: Muestra de Borrelia 5	0	0	0	0
Neg: Muestra de Borrelia 8	0	0	0	0
Neg: Muestra de Borrelia 9	0	0	0	0
Neg: Muestra de Borrelia 10	0	0	0	0
Conjugado solo	0	0	0	0

Los resultados de la Tabla 3 muestran que, en las condiciones de las pruebas, se detectaron en todas las muestras positivas de *Ehrlichia* señales de rann 10, mientras que no se observaron señales falsas positivas con las muestras negativas de *Ehrlichia*.

Ejemplo 3

Efectuando pruebas de tira reactiva según el procedimiento del Ejemplo 1, se analizaron diluciones en serie de la muestra sérica BH19 positiva de *Ehrlichia* con la muestra sérica R09266-008 negativa de *Ehrlichia*. Se muestran los resultados en la Tabla 4.

Tabla 4

Factor de dilución	Tira reactiva 1 (Op1)	Tira reactiva 2 (Op1)	Tira reactiva 3 (Op1)	Media	D.E.
0	10	10	10	10	0
2	10	10	10	10	0
10	10	9	10	9,7	0,6
50	9	9	9	9	0
100	8	8	8	8	0
150	6	6	6	6	0
200	6	6	6	6	0
300	5	5	5	5	0
500	4	4	4	4	0
1000	3	3	3	3	0
2000	3	3	3	3	0

5 Como se muestra en la Tabla 4, la dilución aumentada del suero positivo de *Ehrlichia* con el suero negativo de *Ehrlichia* daba como resultado observar intensidades de señal disminuidas. Esto indica que las señales específicas de *Ehrlichia* se están detectando como resultado del anticuerpo presente en la muestra positiva, y no debido a interferencia de matriz u otra unión no específica.

Ejemplo 4

10 Se sintetizaron dos mezclas diferentes de péptidos biotinilados que tienen cada una una secuencia de SEQ ID NO: 96 o SEQ ID NO: 97 usando procedimientos de síntesis estándares:

SEQ ID NO: 96: F-S-A-K-E-E-X₇-A-E-T-K-X₁₂-T-F-G-L-X₁₇-K-N-Y-D-G-A-X₂₄-I-X₂₆-D-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N

15 SEQ ID NO: 97: F-S-A-K-E-E-X₇-A-E-T-R-X₁₂-T-F-G-L-X₁₇-K-Q-Y-D-G-A-X₂₄-I-X₂₆-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N, donde X₇, X₁₂, X₁₇, X₂₄ y X₂₆ son cualquier aminoácido.

20 Cada mezcla era una mezcla equimolar de todos los L-aminoácidos naturales en las posiciones "X". Se disolvieron estas dos mezclas peptídicas individualmente en agua destilada a 1 mg/ml. Calentar a 40 °C facilitó la disolución. Se disolvió estreptavidina adquirida comercialmente en agua a temperatura ambiente. Se mezcló la estreptavidina con péptidos individuales, produciendo una concentración final de estreptavidina 5 µg/ml y péptidos 2,5 µg/ml con SEQ ID NO: 96 o SEQ ID NO: 97 usando tampón Tris.

25 Se usaron los complejos de estreptavidina-péptido así formados para recubrir pocillos de placas ELISA. Se escurrió la mezcla no unida y se bloquearon las placas para evitar una unión no específica indeseable. Se dejaron reaccionar entonces muestras de suero de perro positivas de especies de *Ehrlichia*, como se determina mediante ensayos de inmunofluorescencia indirectos, con los péptidos que comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 96 o SEQ ID NO: 97. Después de 1 hora de incubación, se retiraron los materiales no unidos y se lavaron las placas. Se realizó la unión de IgG de perro a los pocillos haciendo reaccionar la IgG unida con (i) el conjugado con HRP de cabra anti-perro y (ii) visualizando la HRP unida con un sustrato TMB comercial.

30 Se encontró que dos de las muestras de suero de perro reaccionan con ambas mezclas de péptidos que comprenden secuencias de SEQ ID NO: 96 o SEQ ID NO: 97, pero no con péptidos diseñados específicamente para identificar a *E. chaffeensis*. De forma similar, 13 muestras de suero de perro reaccionaron con los péptidos diseñados para detectar *E. chaffeensis*, pero no con los péptidos que comprenden la SEQ ID NO: 96 o SEQ ID NO: 35 97. Por tanto, una combinación de péptidos que comprenden la SEQ ID NO: 96, péptidos que comprenden la SEQ ID NO: 97 y péptidos que detectan *E. chaffeensis* es capaz de detectar todos los animales que albergan anticuerpos contra las especies *Ehrlichia canis*, *chaffeensis* y *ewingii*.

40 En la medida en que cualquier definición de los documentos sea inconsistente con las definiciones proporcionadas en la presente memoria, prevalecen las definiciones proporcionadas en la presente memoria. Aunque la invención se ha descrito con referencia a realizaciones actualmente preferidas y los ejemplos no limitantes anteriores, la invención está limitada solo por las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

45 <110> Abaxis, Inc. Mehra, Rajesh K. Aron, Kenneth P. Bleile, Dennis M.

<120> PÉPTIDOS, DISPOSITIVOS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DE EHRLICHIA

50 <130> ABAX-036/01WO

<150> US 61/263.329
 <151> 20-11-2009

 <160> 97
 5
 <170> PatentIn versión 3.5

 <210> 1
 <211> 40
 10 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (1)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 20 <223> Xaa puede ser Asn o Gln

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 25 <223> Xaa puede ser Thr o Pro

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 30 <223> Xaa puede ser Thr o Val

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 35 <223> Xaa puede ser Gly o Ala

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 40 <223> Xaa puede ser Leu o Val

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 45 <223> Xaa puede ser Tyr o Phe

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 50 <223> Xaa puede ser Asp o Asn

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 55 <223> Xaa puede ser Asp o Asn

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 60 <223> Xaa puede ser Ser o Val

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 65 <223> Xaa puede ser Ala, Ser, o Thr

ES 2 596 952 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24) .. (24)
 <223> Xaa puede ser Ala o Ile
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25) .. (25)
 <223> Xaa puede ser Ser, Thr, o Pro
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa puede ser Ser, Asn, o Lys
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(40)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 20
 <400> 1
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Leu Lys
 1 5 10 15
 Gln Xaa Trp Xaa Gly Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40
 <210> 2
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.
 <400> 2
 Lys Arg Asp Glu Asn Gln
 1 5
 30 <210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.
 35 <400> 3
 Gln Arg Lys Asn Asp Pro Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 40 <213> Ehrlichia sp.
 <400> 4
 Met Ala Pro Phe His Glu Leu Asp Val Asn Asn His Pro Asn
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.
 45
 <400> 5
 Ser Leu Asn Val Ser Phe Leu Ile Asp Pro Met Ala Pro Phe
 1 5 10
 50 <210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

ES 2 596 952 T3

<400> 6
 Gln Asp Ser Asn Leu Tyr Ser Ser Ile Phe Phe Val Pro Gln
 1 5 10
 <210> 7
 5 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

<400> 7
 Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Thr Ser Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

10 Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40
 <210> 8
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

15 <400> 8
 Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Thr Ser Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

20 Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40
 <210> 9
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

<400> 9
 Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Thr Ser Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

25 Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40
 <210> 10
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

30 <400> 10
 Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Thr Ser Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40
 <210> 11

ES 2 596 952 T3

<211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

5 <400> 11
 Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Thr Ser Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

10 <210> 12
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

<400> 12
 Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Thr Ser Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

15 Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 13
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

20 <400> 13
 Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Thr Ser Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

25 <210> 14
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

<400> 14
 Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Thr Ser Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

30 <210> 15
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

35 <400> 15

ES 2 596 952 T3

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Pro Ser Gln Arg Lys Asn Asp Pro
20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
35 40

<210> 16

<211> 40

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia sp.

<400> 16

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Pro Ser Gln Arg Lys Asn Asp Pro
20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
35 40

<210> 17

<211> 40

<212> PRT

10 <213> Ehrlichia sp.

<400> 17

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Pro Ser Gln Arg Lys Asn Asp Pro
20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
35 40

<210> 18

<211> 40

<212> PRT

15 <213> Ehrlichia sp.

<400> 18

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Pro Ser Gln Arg Lys Asn Asp Pro
20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
35 40

<210> 19

<211> 40

<212> PRT

25 <213> Ehrlichia sp.

<400> 19

30

ES 2 596 952 T3

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Pro Ser Gln Arg Lys Asn Asp Pro
20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
35 40

<210> 20

<211> 40

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia sp.

<400> 20

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Pro Ser Gln Arg Lys Asn Asp Pro
20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
35 40

<210> 21

<211> 40

<212> PRT

10 <213> Ehrlichia sp.

<400> 21

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Pro Ser Gln Arg Lys Asn Asp Pro
20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
35 40

<210> 22

<211> 40

<212> PRT

15 <213> Ehrlichia sp.

<400> 22

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Pro Ser Gln Arg Lys Asn Asp Pro
20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
35 40

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

25 <213> Ehrlichia sp.

<400> 23

Ser Val Lys Glu Glu Lys
1 5

30 <210> 24

<211> 6

<212> PRT

ES 2 596 952 T3

<213> Ehrlichia sp.

<400> 24
 Ser Ala Lys Glu Asp Lys
 1 5

5 <210> 25
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

10 <400> 25
 Ser Ala Lys Glu Glu Lys
 1 5
 <210> 26
 <211> 6
 <212> PRT

15 <213> Ehrlichia sp.

<400> 26
 Lys Arg Asp Glu Asn Gln
 1 5
 <210> 27
 <211> 40
 <212> PRT

20 <213> Ehrlichia sp.

<400> 27
 Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15
 Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Thr Asn Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

25 Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40
 <210> 28
 <211> 40
 <212> PRT

30 <213> Ehrlichia sp.

<400> 28
 Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15
 Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Thr Asn Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

35 Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40
 <210> 29
 <211> 40
 <212> PRT

<213> Ehrlichia sp.

<400> 29
 Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15
 Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Thr Asn Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

ES 2 596 952 T3

<210> 30
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.
 5
 <400> 30
 Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15
 Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Thr Asn Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30
 Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40
 10 <210> 31
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.
 15 <400> 31
 Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15
 Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Thr Asn Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30
 Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40
 20 <210> 32
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.
 <400> 32
 Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15
 Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Thr Asn Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30
 Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40
 25 <210> 33
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.
 <400> 33
 Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15
 Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Thr Asn Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30
 Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40
 30 <210> 34
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.
 35 <400> 34

ES 2 596 952 T3

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Thr Asn Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 35

<211> 40

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia sp.

<400> 35

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Pro Asn Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 36

<211> 40

<212> PRT

10 <213> Ehrlichia sp.

<400> 36

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Pro Asn Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 37

<211> 40

<212> PRT

15 <213> Ehrlichia sp.

<400> 37

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Pro Asn Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 38

<211> 40

<212> PRT

25 <213> Ehrlichia sp.

<400> 38

30

ES 2 596 952 T3

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Pro Asn Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 39

<211> 40

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia sp.

<400> 39

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Pro Asn Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 40

<211> 40

<212> PRT

10 <213> Ehrlichia sp.

<400> 40

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Pro Asn Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 41

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Ehrlichia sp.

<400> 41

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Pro Asn Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 42

<211> 40

<212> PRT

25 <213> Ehrlichia sp.

<400> 42

30

ES 2 596 952 T3

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Pro Asn Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 43

<211> 40

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia sp.

<400> 43

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Thr Lys Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 44

<211> 40

<212> PRT

10 <213> Ehrlichia sp.

<400> 44

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Thr Lys Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 45

<211> 40

<212> PRT

15 <213> Ehrlichia sp.

<400> 45

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Thr Lys Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 46

<211> 40

<212> PRT

25 <213> Ehrlichia sp.

<400> 46

ES 2 596 952 T3

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Thr Lys Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 47

<211> 40

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia sp.

<400> 47

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Thr Lys Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

10 <210> 48

<211> 40

<212> PRT

<213> Ehrlichia sp.

15 <400> 48

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Thr Lys Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 49

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Ehrlichia sp.

<400> 49

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Thr Lys Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

25 <210> 50

<211> 40

<212> PRT

<213> Ehrlichia sp.

30 <400> 50

ES 2 596 952 T3

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Thr Lys Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 51

<211> 40

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia sp.

<400> 51

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Pro Lys Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 52

<211> 40

<212> PRT

10 <213> Ehrlichia sp.

<400> 52

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Pro Lys Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 53

<211> 40

<212> PRT

15 <213> Ehrlichia sp.

<400> 53

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Pro Lys Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 54

<211> 40

<212> PRT

25 <213> Ehrlichia sp.

<400> 54

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

30

ES 2 596 952 T3

Gln Asp Trp Asp Gly Ser Ala Ala Pro Lys Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 55

<211> 40

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia sp.

<400> 55

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Pro Lys Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 56

<211> 40

<212> PRT

10 <213> Ehrlichia sp.

<400> 56

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Pro Lys Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 57

<211> 40

<212> PRT

15 <213> Ehrlichia sp.

<400> 57

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Thr Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Pro Lys Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 58

<211> 40

<212> PRT

20 <213> Ehrlichia sp.

<400> 58

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Asp Trp Asp Gly Val Ala Ala Pro Lys Gln Arg Lys Asn Asp Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 59
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser Glu o Gln
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser Glu o Gln
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa puede ser Lys o Arg
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa puede ser Leu o Ile
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa puede ser Arg o Lys
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa puede ser Gln o Asn
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa puede ser Tyr o Thr
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa puede ser Ile o Leu
 65
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (27)
 <223> Xaa puede ser Asp o Glu

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29) .. (29)
 <223> Xaa puede ser Glu o Gln

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa puede ser Glu o Gln

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa puede ser Lys o Arg

25

<400> 59
 Phe Ser Ala Lys Xaa Xaa Xaa Ala Glu Thr Xaa Xaa Thr Phe Gly Xaa
 1 5 10 15

 Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Gly Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Val Xaa Asn
 20 25 30

 Xaa Phe Thr Ile Ser Asn
 35
 <210> 60
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

30

<400> 60
 Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Lys Lys Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

 Glu Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Glu Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

 Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35
 <210> 61
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

35

<400> 61
 Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Lys Lys Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

 Glu Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Thr Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

 Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35
 <210> 62

40

ES 2 596 952 T3

<211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

5 <400> 62
 Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Lys Lys Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Glu Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Glu Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

<210> 63
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

10

<400> 63
 Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Lys Lys Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Glu Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Thr Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

15 <210> 64
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

20

<400> 64
 Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Lys Lys Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Asp Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Glu Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

25 <210> 65
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

<400> 65
 Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Lys Lys Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Asp Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Thr Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

30 <210> 66
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

35 <400> 66

ES 2 596 952 T3

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Lys Lys Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Asp Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Glu Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

<210> 67

<211> 38

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia sp.

<400> 67

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Lys Lys Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Asp Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Thr Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

<210> 68

<211> 38

<212> PRT

10 <213> Ehrlichia sp.

<400> 68

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Lys Arg Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Glu Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Glu Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

<210> 69

<211> 38

<212> PRT

15 <213> Ehrlichia sp.

<400> 69

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Lys Arg Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Glu Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Thr Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

<210> 70

<211> 38

<212> PRT

25 <213> Ehrlichia sp.

<400> 70

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Lys Arg Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

30

ES 2 596 952 T3

Glu Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Glu Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

<210> 71
 <211> 38
 <212> PRT

5 <213> Ehrlichia sp.

<400> 71

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Lys Arg Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Glu Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Thr Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

<210> 72
 <211> 38
 <212> PRT

10 <213> Ehrlichia sp.

<400> 72

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Lys Arg Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Asp Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Thr Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

<210> 73
 <211> 38
 <212> PRT

15 <213> Ehrlichia sp.

<400> 73

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Lys Arg Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Asp Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Glu Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

<210> 74
 <211> 38
 <212> PRT

25 <213> Ehrlichia sp.

<400> 74

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Lys Arg Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Asp Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Glu Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

ES 2 596 952 T3

<210> 75
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

5

<400> 75
 Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Lys Arg Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

 Asp Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Thr Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

 Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35
 <210> 76
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

10

<400> 76
 Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Lys Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

 Glu Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Glu Glu Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

 Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35
 <210> 77
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

15

<400> 77
 Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Lys Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

 Glu Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Thr Glu Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

 Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35
 <210> 78
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

20

<400> 78
 Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Lys Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

 Glu Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Glu Glu Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

 Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35
 <210> 79
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

25

<400> 79
 Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Lys Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

 Glu Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Glu Glu Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

 Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35
 <210> 79
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

30

ES 2 596 952 T3

<400> 79

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Lys Thr Phe Gly Leu
1 5 10 15

Glu Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Thr Glu Asn Gln Val Gln Asn
20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
35

5 <210> 80
<211> 38
<212> PRT
<213> Ehrlichia sp.

<400> 80

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Lys Thr Phe Gly Leu
1 5 10 15

Asp Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Glu Glu Asn Gln Val Gln Asn
20 25 30

10 Lys Phe Thr Ile Ser Asn
35

<210> 81
<211> 38
<212> PRT
15 <213> Ehrlichia sp.

<400> 81

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Lys Thr Phe Gly Leu
1 5 10 15

Asp Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Thr Glu Asn Gln Val Gln Asn
20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
35

20 <210> 82
<211> 38
<212> PRT
<213> Ehrlichia sp.

<400> 82

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Lys Thr Phe Gly Leu
1 5 10 15

Asp Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Glu Glu Asn Gln Val Gln Asn
20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
35

25 <210> 83
<211> 38
<212> PRT
<213> Ehrlichia sp.

<400> 83

30

ES 2 596 952 T3

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Lys Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Asp Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Thr Glu Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

<210> 84

<211> 38

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia sp.

<400> 84

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Arg Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Glu Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Glu Glu Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

<210> 85

<211> 38

<212> PRT

<213> Ehrlichia sp.

10

<400> 85

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Arg Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Glu Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Thr Glu Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

<210> 86

<211> 38

<212> PRT

<213> Ehrlichia sp.

15

<400> 86

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Arg Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Glu Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Thr Glu Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

<210> 87

<211> 38

<212> PRT

<213> Ehrlichia sp.

25

<400> 87

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Arg Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Glu Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Thr Glu Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

ES 2 596 952 T3

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35
 <210> 88
 <211> 38
 5 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

 <400> 88
 Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Arg Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

 Asp Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Thr Glu Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

 Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35
 10 <210> 89
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

 15 <400> 89
 Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Arg Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

 Asp Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Glu Glu Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

 Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35
 <210> 90
 <211> 38
 <212> PRT
 20 <213> Ehrlichia sp.

 <400> 90
 Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Arg Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

 Asp Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Glu Glu Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

 Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35
 25 <210> 91
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

 <400> 91
 Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Arg Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

 Asp Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Gln Ile Thr Glu Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

 Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35
 30 <210> 92
 <211> 41

<212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

<220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser Asp o Asn

<220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser Glu o Gln

<220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser Glu o Gln

<220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa puede ser Glu o Gln

<220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa puede ser Glu o Gln

<220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> Xaa puede ser Lys o Arg

<400> 92

ES 2 596 952 T3

Gly Xaa Phe Ser Ala Lys Xaa Xaa Lys Xaa Ala Asp Thr Arg Xaa Thr
 1 5 10 15

Phe Gly Leu Xaa Lys Gln Thr Asp Gly Ala Xaa Ile Xaa Glu Asn Xaa
 20 25 30

Val Xaa Asn Xaa Phe Thr Ile Ser Asn
 35 40

<210> 93

<211> 21

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia sp.

<400> 93

Asp Asn Gln Val Gln Asn Lys Phe Thr Ile Ser Asn Tyr Ser Phe Lys
 1 5 10 15

Tyr Glu Asp Asn Pro
 20

<210> 94

10 <211> 35

<212> PRT

<213> Ehrlichia sp.

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (1)..(35)

<223> Puede repetirse 1-10 veces

<400> 94

Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Lys Thr Phe Gly Leu Glu Lys Gln
 1 5 10 15

Tyr Asp Gly Ala Lys Ile Glu Glu Asn Gln Val Gln Asn Lys Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Gly
 35

20 <210> 95

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia de marcador de His

<400> 95

His His His His His His

30 1 5

<210> 96

<211> 38

<212> PRT

<213> Ehrlichia sp.

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

40 <220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24) .. (24)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 20 <223> Puede estar biotinilado

<400> 96
 Phe Ser Ala Lys Glu Glu Xaa Ala Glu Thr Lys Xaa Thr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Xaa Lys Asn Tyr Asp Gly Ala Xaa Ile Xaa Asp Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

<210> 97
 25 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 40 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24) .. (24)
 45 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 50 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 55 <223> Puede estar biotinilado

ES 2 596 952 T3

<400> 97

Phe Ser Ala Lys Glu Glu Xaa Ala Glu Thr Arg Xaa Thr Phe Gly Leu
1 5 10 15

Xaa Lys Gln Tyr Asp Gly Ala Xaa Ile Xaa Glu Asn Gln Val Gln Asn
 20 25 30

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
 35

REIVINDICACIONES

1. Una mezcla de péptidos aislados que comprende tres o más péptidos aislados diferentes, donde cada péptido aislado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 59,
 5 F-S-A-K-X₅-X₆-X₇-A-E-T-X₁₁-X₁₂-T-F-G-X₁₆-X₁₇-X₁₈-X₁₉-X₂₀-D-G-A-X₂₄-X₂₅-X₂₆- X₂₇-N-X₂₉-V-X₃₁-N-X₃₃-F-T-I-S-N (SEQ ID NO: 59)
 donde X₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q, X₆ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q, X₇ es cualquier aminoácido, X₁₁ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y R, X₁₂ es cualquier aminoácido, X₁₆ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo
 10 consistente en L e I, X₁₇ es cualquier aminoácido, X₁₈ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en R y K, X₁₉ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en Q y N, X₂₀ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en Y y T, X₂₄ es cualquier aminoácido, X₂₅ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en I y L, X₂₆ es cualquier aminoácido, X₂₇ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en D y E, X₂₉ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q,
 15 X₃₁ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y Q y X₃₃ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y R;
 y
 donde cualquier secuencia peptídica N-terminal o C-terminal de la secuencia de SEQ ID NO: 59 es una secuencia no nativa.
 20
2. La mezcla de la reivindicación 1, que comprende todos los posibles péptidos definidos por la SEQ ID NO: 59.
3. La mezcla de la reivindicación 1, donde X₅ es E, X₆ es E, X₁₆ es L, X₁₈ es K, X₂₀ es Y, X₂₅ es I, X₂₉ es Q, X₃₁ es Q y X₃₃ es K.
 25
4. La mezcla de la reivindicación 1, donde X₇ es K, X₁₂ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y R X₁₇ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y D, X₂₄ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en K y Q y X₂₆ es un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en E y T.
 30
5. La mezcla de la reivindicación 1, donde X₁₁ es R, X₁₉ es Q y/o X₂₇ es E.
6. La mezcla de la reivindicación 1, donde la mezcla comprende diferentes péptidos aislados que tienen una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 60-91.
 35
7. La mezcla de la reivindicación 1, donde la mezcla comprende diferentes péptidos aislados que tienen una secuencia de SEQ ID NO: 96 o 97.
8. La mezcla de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde cada péptido aislado está conjugado con un ligando.
 40
9. La mezcla de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde uno o más de los péptidos aislados está biotinilado.
 45
10. La mezcla de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde uno o más de los péptidos aislados está conjugado con avidina, estreptavidina, neutravidina o seroalbúmina, opcionalmente a través de un residuo de cisteína.
 50
11. La mezcla de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde cada péptido aislado está inmovilizado sobre un soporte sólido.
12. La mezcla de la reivindicación 11, donde el soporte sólido es una perla, una ruta de flujo en un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral, un pocillo en una placa de microvaloración o una ruta de flujo en un rotor.
 55
13. Un kit que comprende la mezcla de péptidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un reactivo de marcaje capaz de unirse a un anticuerpo que reconoce un epítipo de dicho uno o más péptidos aislados.
14. El kit de la reivindicación 13, donde el reactivo de marcaje es un anticuerpo anti-IgG humana o canina conjugado con un marcaje detectable.
 60
15. El kit de la reivindicación 14, donde el marcaje detectable es partículas de oro coloidal.
16. Un procedimiento para detectar en una muestra un anticuerpo contra un epítipo de un antígeno de *Ehrlichia*, comprendiendo el procedimiento:
 65

- poner en contacto una muestra con la mezcla de péptidos aislados de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12;
y
detectar la formación de un complejo de anticuerpo-péptido que comprende uno o más de dichos péptidos aislados de la mezcla,
- 5 donde la formación de dicho complejo es indicativa de que está presente en dicha muestra un anticuerpo contra un epítipo de un antígeno de *Ehrlichia*.
17. El procedimiento de la reivindicación 16, donde dicho antígeno de *Ehrlichia* es de la especie *Ehrlichia chaffeensis* o *Ehrlichia canis*.
- 10 18. El procedimiento de la reivindicación 16, donde dicho antígeno de *Ehrlichia* es de una especie de *Ehrlichia* patogénica.
19. Un procedimiento para diagnosticar ehrliquiosis monocítica en un sujeto, comprendiendo el
procedimiento:
poner en contacto una muestra del sujeto con la mezcla de péptidos aislados de una cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 12; y
detectar la formación de un complejo de anticuerpo-péptido que comprende uno o más de dichos péptidos aislados
de la mezcla, donde la formación del complejo es indicativa de que el sujeto tiene ehrliquiosis monocítica.
- 15 20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde dicha etapa de detección
comprende (i) efectuar un ensayo ELISA, (ii) hacer circular un ensayo de flujo lateral, (iii) efectuar un ensayo de
aglutinación o (iv) hacer circular la muestra a través de un rotor analítico.
- 20 21. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, donde dicha muestra es de un
sujeto humano o canino o se selecciona de entre el grupo consistente en sangre, suero, líquido cefalorraquídeo,
orina o saliva.
- 25

Fig. 1

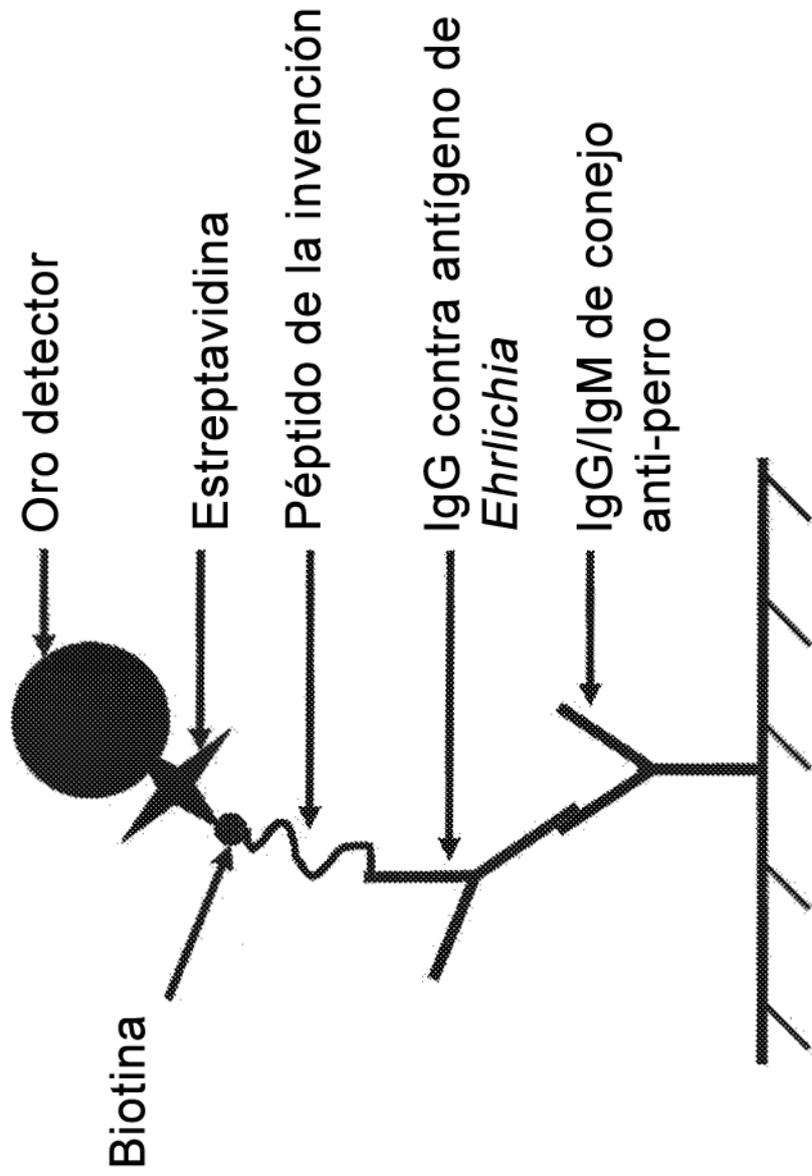


Fig. 2

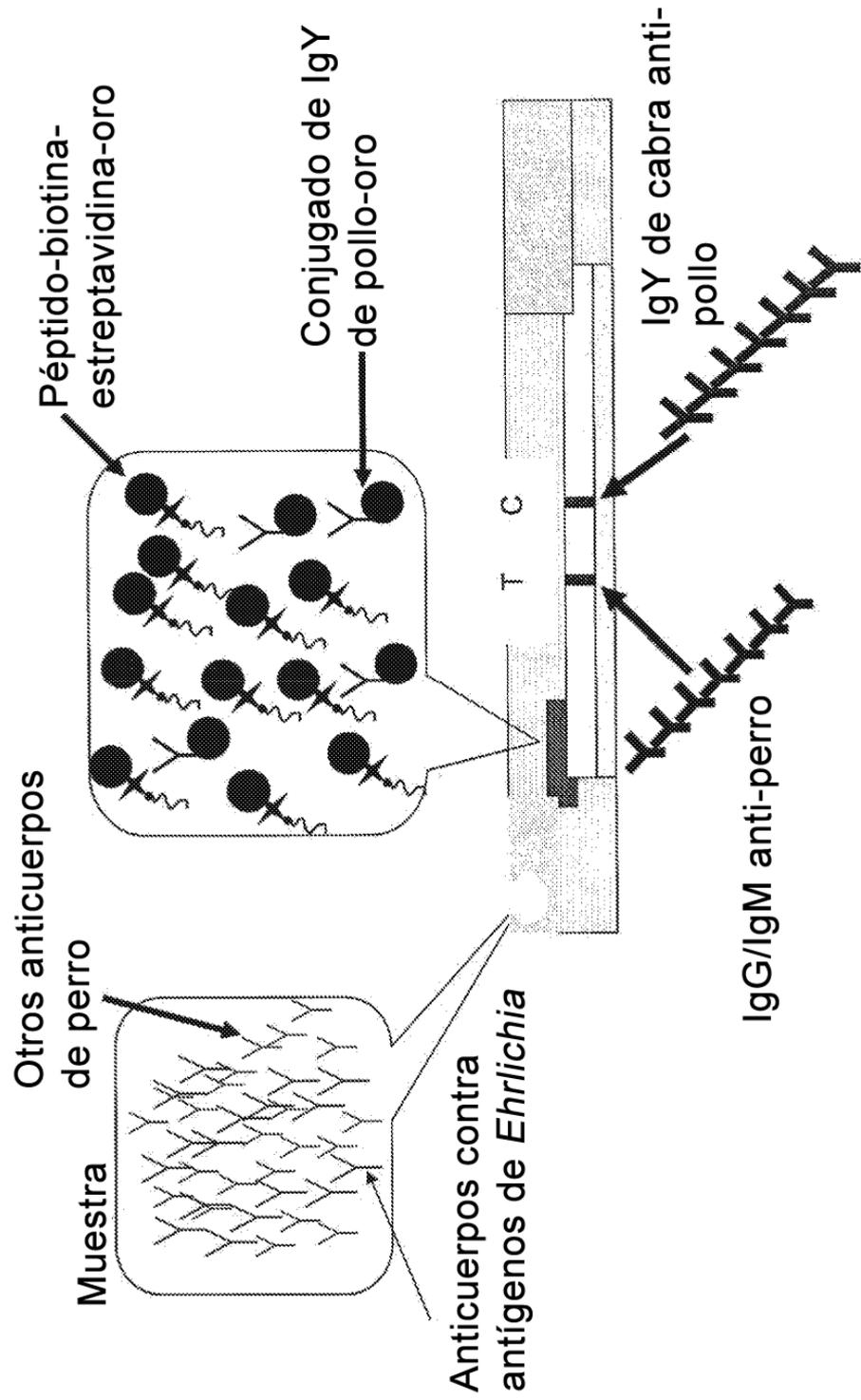
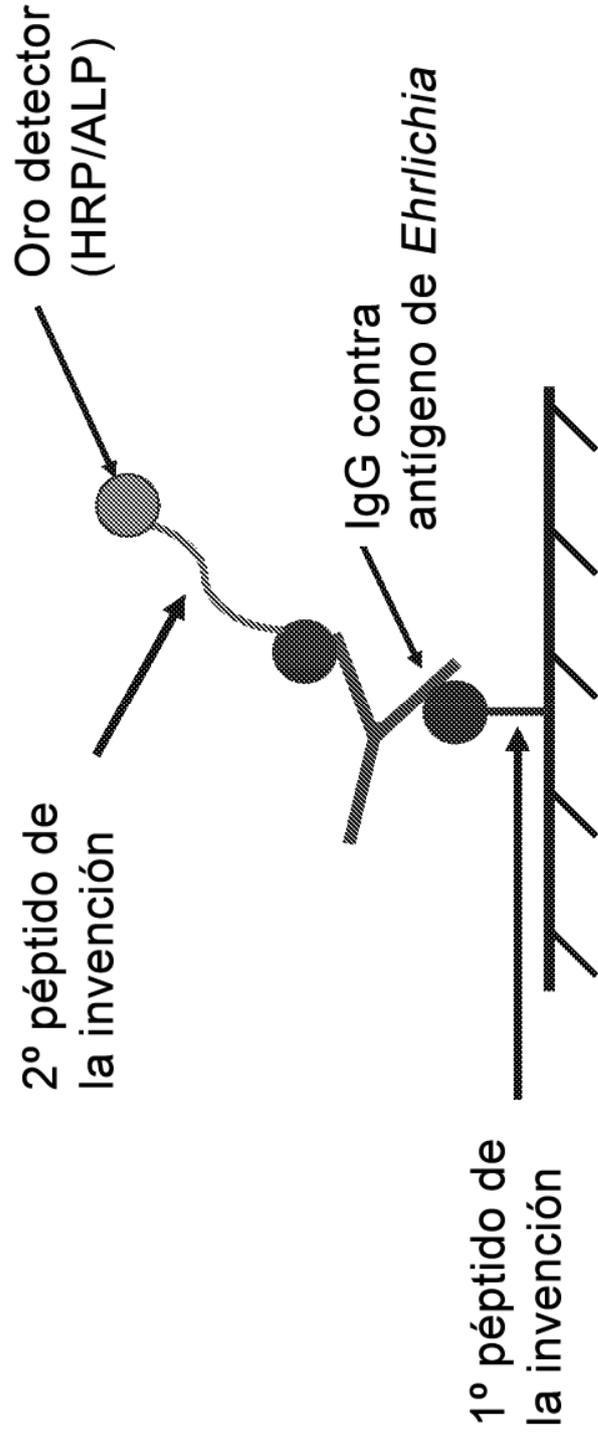


Fig. 3



Sustrato (p.ej. nitrocelulosa, pocillo de plástico de microvaloración)