



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102834411 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201080061669. 1

G01N 33/53(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 11. 19

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

61/263, 329 2009. 11. 20 US

CN 1735684 A, 2006. 02. 15,

US 2002120115 A1, 2002. 08. 29,

WO 2009039414 A2, 2009. 03. 26,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 07. 17

审查员 贾涛

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/057430 2010. 11. 19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/063235 EN 2011. 05. 26

(73) 专利权人 爱贝斯股份有限公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 R·K·梅拉 K·P·阿伦

D·M·布莱利

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

(51) Int. Cl.

C07K 14/195(2006. 01)

C07K 19/00(2006. 01)

权利要求书2页 说明书29页

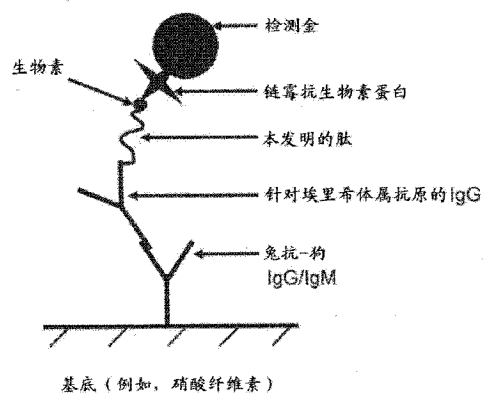
序列表27页 附图3页

(54) 发明名称

用于检测埃里希体属抗体的肽、装置和方法

(57) 摘要

本发明提供了用于检测结合埃里希体属抗原的抗体的组合物(例如,肽组合物)。肽组合物包含基于埃里希体属外膜蛋白1(OMP-1)蛋白的免疫原性片段的多肽序列。本发明还提供了包含这类肽组合物和用于检测结合埃里希体属抗原的抗体和诊断单核细胞埃里希体病的装置、方法和试剂盒。



1. 分离的肽的混合物,其包含 10 或更多种不同的分离的肽,每种肽由 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 或 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 的序列组成,其中 X₇、X₁₂、X₁₇、X₂₄和 X₂₆是任意氨基酸。

2. 分离的肽的混合物,其包含 10 或更多种不同的分离的肽,每种肽由 SEQ ID NO:1 的序列 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组成:

其中 X₁为选自 S 和 K 的氨基酸,X₂为选自 A、V 和 R 的氨基酸,X₃为选自 K 和 D 的氨基酸,X₄为 E,X₅为选自 E、D 和 N 的氨基酸,X₆为选自 K 和 Q 的氨基酸,X₇为选自 N 和 Q 的氨基酸,X₈为选自 T 和 P 的氨基酸,X₁₀为选自 T 和 V 的氨基酸,X₁₁为选自 G 和 A 的氨基酸,X₁₂为选自 L 和 V 的氨基酸,X₁₃为选自 Y 和 F 的氨基酸,X₁₈为选自 D 和 N 的氨基酸,X₂₀为选自 D 和 N 的氨基酸,X₂₂为选自 S 和 V 的氨基酸,X₂₃为选自 A、S 和 T 的氨基酸,X₂₄为选自 A 和 I 的氨基酸,X₂₅为选自 S、T 和 P 的氨基酸,X₂₆为选自 S、N 和 K 的氨基酸,以及 X₂₇-X₄₀是任意氨基酸。

3. 根据权利要求 2 所述的混合物,其中 X₁为 S,X₂为选自 A 和 V 的氨基酸,X₃为 K,X₄为 E,X₅为选自 E 和 D 的氨基酸,并且 X₆为 K。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的混合物,其中 X₇为 Q,并且 X₂₅为选自 T 和 P 的氨基酸。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的混合物,其中每种分离的肽均缀合至配体。

6. 根据权利要求 1-4 任一项所述的混合物,其中一或多种分离的肽被生物素化。

7. 根据权利要求 1-4 任一项所述的混合物,其中一或多种分离的肽缀合至抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白、或血清白蛋白,任选地是经过半胱氨酸残基缀合。

8. 根据权利要求 1-4 任一项所述的混合物,其中每种分离的肽均被固定至固体支持物。

9. 根据权利要求 8 所述的混合物,其中所述固体支持物是珠粒、侧流免疫测定装置中的流动通道、微量滴定板中的孔、或转头中的流动通道。

10. 根据权利要求 1 或 2 所述的混合物,其中所述混合物包含 20 或更多种不同的分离的肽。

11. 一种试剂盒,其包含权利要求 1-10 任一项所述的肽的混合物,以及能够结合至识别所述一种或更多种分离的肽的表位的抗体的标记试剂。

12. 根据权利要求 11 所述的试剂盒,其中所述标记试剂为缀合至可检测标记物的抗-人或抗-犬 IgG 抗体。

13. 根据权利要求 12 所述的试剂盒,其中所述可检测标记物为胶体金颗粒。

14. 权利要求 1-10 任一项所述的分离的肽的混合物在制备用于通过如下方法检测样品中的针对埃里希体属抗原的表位的抗体的试剂盒中的应用,所述方法包括:

将样品与权利要求 1-10 任一项所述的分离的肽的混合物接触;和

检测抗体-肽复合物的形成,所述抗体-肽复合物包含混合物中的一种或更多种所述分离的肽,

其中所述复合物的形成表明针对埃里希体属抗原的表位的抗体存在于所述样品中。

15. 根据权利要求 14 所述的应用,其中所述埃里希体属抗原来自恰菲埃里希体或犬埃里希体物种。

16. 根据权利要求 14 所述的应用,其中所述埃里希体属抗原来自病原性埃里希体属的物种。

17. 权利要求 1-10 任一项所述的分离的肽的混合物在制备通过如下方法诊断受试者的单核细胞埃里希体病的试剂盒中的应用,所述方法包括:

将来自所述受试者的样品与权利要求 1-10 任一项所述的分离的肽的混合物接触;和检测抗体-肽复合物的形成,所述抗体-肽复合物包含混合物中的一种或更多种所述分离的肽,

其中所述复合物的形成表明所述受试者患有单核细胞埃里希体病。

18. 根据权利要求 14-17 任一项所述的应用,其中所述检测步骤包括 (i) 进行 ELISA 测定, (ii) 进行侧流测定, (iii) 进行凝集测定或 (iv) 通过分析转头运行所述样品。

19. 根据权利要求 14-18 任一项所述的应用,其中所述样品来自人或犬受试者。

20. 根据权利要求 14-18 任一项所述的应用,其中所述样品选自血液、血清、脑脊髓液、尿、或唾液。

用于检测埃里希体属抗体的肽、装置和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2009 年 11 月 20 日提交的美国临时申请第 61/263,329 号的权益,该临时申请以引用的方式整体并入本文。

[0003] 电子提交的文本文件的描述

[0004] 随同电子提交的文本文件的内容通过引用整体并入本文:序列表的计算机可读格式拷贝(文件名:ABAX_036_01WO_SeqList_ST25.txt,记录日期:2010 年 11 月 18 日,文件大小 41 千字节)。

[0005] 发明背景

[0006] 埃里希体属(*Ehrlichia*)细菌是感染哺乳动物宿主中循环淋巴细胞的专性细胞内病原体。犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)和恰菲埃里希体(*Ehrlichia chaffeensis*)是分别感染犬和人并且引发犬单核细胞埃里希体病(CME)和人单核细胞埃里希体病(HME)的相同亚属组的成员。犬疾病的特征在于发热、淋巴结病、体重减轻和全血细胞减少症。在人中,疾病的特征在于发热、头痛、肌痛和白细胞减少。早期检测和治疗对于治疗犬和人埃里希体病是非常重要的。

[0007] 间接免疫荧光测定法(IFA)和酶联免疫吸附测定法(ELISA)通常用于这类疾病的诊断。这类测定法测量或以其它方式检测来自受试者的血液、血浆或血清的抗-埃里希体属抗体对感染的细胞、细胞裂解物或部分纯化的全埃里希体属蛋白的结合。然而,目前已知的用于检测抗-埃里希体属抗体或其片段的测定法因与这类测试中使用的埃里希体属抗原的不纯性质直接相关的敏感性和特异性问题而在效用上受到严重限制。即,目前已知的测定法使用许多全埃里希体属抗原或非物种特异性抗原的混合物。

[0008] 因此,本领域中仍然需要用于检测埃里希体属抗原和进行单核细胞埃里希体病血清学诊断的其它测定法。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明部分基于这样的发现:埃里希体属外膜蛋白 1(OMP-1)蛋白质的片段的某些序列变体可对针对多种埃里希体属物种的抗体反应提供稳健的检测。因此,本发明提供了用于检测结合埃里希体属抗原的抗体和诊断单核细胞埃里希体病的组合物、装置、方法和试剂盒。

[0011] 在一个方面,本发明提供了能够结合识别埃里希体属抗原的抗体的肽。在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-T-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-G-L-K-Q-X_{18}-W-X_{20}-G-X_{22}-X_{23}-X_{24}-X_{25}-X_{26}-X_{27}-X_{28}-X_{29}-X_{30}-X_{31}-X_{32}-X_{33}-X_{34}-X_{35}-X_{36}-X_{37}-X_{38}-X_{39}-X_{40}$ (SEQ ID NO:1),其中 X_1-X_6 和 $X_{27}-X_{40}$ 的每一个为任意氨基酸, X_7 为选自 N 和 Q 的氨基酸, X_8 为选自 T 和 P 的氨基酸, X_{10} 为选自 T 和 V 的氨基酸, X_{11} 为选自 G 和 A 的氨基酸, X_{12} 为选自 L 和 V 的氨基酸, X_{13} 为选自 Y 和 F 的氨基酸, X_{18} 为选自 D 和 N 的氨基酸, X_{20} 为选自 D 和 N 的氨基酸, X_{22} 为选自 S 和 V 的氨基酸, X_{23} 为选自 A、S 和 T 的氨基酸, X_{24} 为选自 A 和 I 的氨基酸, X_{25} 为选自 S、T 和 P 的氨基酸,以及 X_{26} 为选自 S、N 和 K 的氨基酸。

[0012] 在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 X_7 为 Q,并

且 X_{25} 为选自 T 和 P 的氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 X_7 为 N 并且 X_{25} 为 S。在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 X_1 为选自 S 和 K 的氨基酸, X_2 为选自 A、V 和 R 氨基酸, X_3 为选自 K 和 D 的氨基酸, X_4 为 E, X_5 为选自 E、D 和 N 的氨基酸, X_6 为选自 K 和 Q 的氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中, X_1 为 S, X_2 为选自 A 和 V 的氨基酸, X_3 为 K, X_4 为 E, X_5 为选自 E 和 D 的氨基酸,并且 X_6 为 K。在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 $X_1 - X_6$ 具有序列 K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO:2)。在某些实施方案中, $X_{27} - X_{40}$ 具有选自 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) 和 Q-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q (SEQ ID NO:6) 的序列。

[0013] 在其它实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:59 的序列 F-S-A-K- X_5 - X_6 - X_7 -A-E-T- X_{11} - X_{12} -T-F-G- X_{16} - X_{17} - X_{18} - X_{19} - X_{20} -D-G-A- X_{24} - X_{25} - X_{26} - X_{27} -N- X_{29} -V- X_{31} -N- X_{33} -F-T-I-S-N (SEQ ID NO:59), 其中 X_5 为选自 E 和 Q 的氨基酸, X_6 为选自 E 和 Q 的氨基酸, X_7 为任意氨基酸, X_{11} 为选自 K 和 R 的氨基酸, X_{12} 为任意氨基酸, X_{16} 为选自 L 和 I 的氨基酸, X_{17} 为任意氨基酸, X_{18} 为选自 R 和 K 的氨基酸, X_{19} 为选自 Q 和 N 的氨基酸, X_{20} 为选自 Y 和 T 的氨基酸, X_{24} 为任意氨基酸, X_{25} 为选自 I 和 L 的氨基酸, X_{26} 为任意氨基酸, X_{27} 为选自 D 和 E 的氨基酸, X_{29} 为选自 E 和 Q 的氨基酸, X_{31} 为选自 E 和 Q 的氨基酸, 以及 X_{33} 为选自 K 和 R 的氨基酸。

[0014] 在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:59 的序列,其中 X_5 为 E, X_6 为 E, X_{16} 为 L, X_{18} 为 K, X_{20} 为 Y, X_{25} 为 I, X_{29} 为 Q, X_{31} 为 Q, 以及 X_{33} 为 K。在其它实施方案中,本发明的肽包含或由 SEQ ID NO:59 的序列组成,其中 X_7 为 K, X_{12} 为选自 K 和 R 的氨基酸, X_{17} 为选自 E 和 D 的氨基酸, X_{24} 为选自 K 和 Q 的氨基酸, 以及 X_{26} 为选自 E 和 T 的氨基酸。

[0015] 在其它实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:92 的序列 G- X_2 -F-S-A-K- X_7 - X_8 -K- X_{10} -A-D-T-R- X_{15} -T-F-G-L- X_{20} -K-Q-T-D-G-A- X_{27} -I- X_{29} -E-N- X_{32} -V- X_{34} -N- X_{36} -F-T-I-S-N (SEQ ID NO:92), 其中 X_2 为选自 D 和 N 的氨基酸, X_7 为选自 E 和 Q 的氨基酸, X_8 为选自 E 和 Q 的氨基酸, X_{10} 为任意氨基酸, X_{15} 为任意氨基酸, X_{20} 为任意氨基酸, X_{27} 为任意氨基酸, X_{29} 为任意氨基酸, X_{32} 为选自 E 和 Q 的氨基酸, X_{34} 为选自 E 和 Q 的氨基酸, 以及 X_{36} 为选自 K 和 R 的氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:92 的序列或由其组成,其中 X_2 为 N, X_7 为 E, X_8 为 E, X_{32} 为 Q, X_{34} 为 Q, 以及 X_{36} 为 K。

[0016] 在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 的序列并且还包括额外的 N-末端肽序列。额外的 N-末端肽序列可包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个氨基酸并且可以是天然或非天然序列。在某些实施方案中,本发明的肽包含由 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 定义的序列并且还包括额外的 C-末端肽序列。额外的 C-末端肽序列可包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个氨基酸并且可以是天然或非天然序列。在某些实施方案中,非天然序列包含非 -OMP-1 埃里希体属抗原 (例如,埃里希体属 p38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200 或 HGE-3)。

[0017] 在某些实施方案中,本发明的肽包含至少 25、30、35、40、45、50 或更多个氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽是分离的 (例如,合成和 / 或纯化的) 肽。在某些实施方案中,本发明的肽被缀合至配体。例如,在某些实施方案中,肽被生物素化。在其它实施方案中,肽被缀合至链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白或中性抗生物素蛋白。在其它实施方案

中,肽被缀合至载体蛋白(例如,血清白蛋白或免疫球蛋白 Fc 结构域)。在其它实施方案中,肽被缀合至树状聚合物和/或为多抗原肽体系(MAPS)的部分。

[0018] 在某些实施方案中,本发明的肽被连接至或固定在固体支持物上。在某些实施方案中,固体支持物为珠粒(例如,胶粒、纳米颗粒、胶乳珠粒等)、侧流免疫测定装置中的流的流动通道(flow path)(例如,多孔膜)、分析转头中的流动通道或管或孔(例如,在适用于 ELISA 测定的板中)。

[0019] 在另一个方面,本发明提供了包含两种或更多种本发明的肽的组合物。例如,在某些实施方案中,组合物包含 2、3、4 或更多种不同的本发明的肽的混合物,其中每一种肽包含 SEQ ID NO:1 的序列。在某些实施方案中,组合物包含 2、3、4 或更多种不同的本发明的肽的混合物,其中每一种肽包含 SEQ ID NO:59 的序列。在其它实施方案中,组合物包括 2、3、4 或更多种不同的本发明的肽的混合物,其中每一种肽包含 SEQ ID NO:92 的序列。

[0020] 在某些实施方案中,肽被缀合至配体。例如,在某些实施方案中,肽被生物素化。在其它实施方案中,肽被缀合至链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白或中性抗生物素蛋白。在其它实施方案中,肽被缀合至载体蛋白(例如,血清白蛋白或免疫球蛋白 Fc 结构域)。在其它实施方案中,肽被缀合至树状聚合物和/或为多抗原肽体系(MAPS)的部分。

[0021] 在另一个方面,本发明提供了包含编码本发明的肽的序列的核酸。此外,本发明提供了包含这类核酸的载体以及包含此类载体的宿主细胞。在某些实施方案中,载体为穿梭载体。在其它实施方案中,载体为表达载体(例如,细菌或真核表达载体)。在某些实施方案中,宿主细胞为细菌细胞。在其它实施方案中,宿主细胞为真核细胞。

[0022] 在另一个方面,本发明提供了装置。在某些实施方案中,装置对于进行免疫测定是有用的。例如,在某些实施方案中,装置为侧流免疫测定装置。在其它实施方案中,装置为分析转头。在其它实施方案中,装置为管或孔(例如在适用于 ELISA 测定的板中)。在其它实施方案中,装置为电化学、光学或光电传感器。

[0023] 在某些实施方案中,所述装置包括本发明的肽。在其它实施方案中,所述装置包括不同的本发明的肽的混合物。例如,在某些实施方案中,所述装置包括 2、3、4 或更多种不同的本发明的肽。在某些实施方案中,肽或混合物中的每一种肽包括 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 的序列。在某些实施方案中,肽被连接至或固定在装置上。

[0024] 在另一个方面,本发明提供了检测样品中针对埃里希体属抗原的表位的抗体。在某些实施方案中,所述方法包括将样品与本发明的肽接触,并检测包含所述肽的抗体-肽复合物的形成,其中所述复合物的形成表明所述样品中存在针对埃里希体属抗原的表位的抗体。在某些实施方案中,埃里希体属抗原来自感染性埃里希体属物种例如犬埃里希体和恰菲埃里希体。在某些实施方案中,所述方法包括将样品与 2、3、4 或更多种不同的本发明的肽的混合物接触。

[0025] 在某些实施方案中,肽或混合物中的每一种肽为分离的(例如,合成和/或纯化的)肽。在某些实施方案中,肽或肽的混合物被连接至或固定在固体支持物上。在某些实施方案中,固体支持物为珠粒(例如,胶粒、纳米颗粒、胶乳珠粒等)、侧流免疫测定装置中的流动通道(例如,多孔膜)、分析转头中的流动通道或管或孔(例如,在适用于 ELISA 测定的板中)。在某些实施方案中,固体支持物包括金属、玻璃、基于纤维素的材料(例如,硝酸纤维素)或聚合物(例如,聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚酯、尼龙、聚砜等)。在某些实施方

案中,肽或不同肽的混合物被连接至树状聚合物和 / 或掺入 MAPS 体系。

[0026] 在某些实施方案中,检测步骤包括进行 ELISA 测定。在其它实施方案中,检测步骤包括进行侧流免疫测定法(侧流免疫测定)。在其它实施方案中,检测步骤包括进行凝集测定。在其它实施方案中,检测步骤包括在分析转头中离心样品。在其它实施方案中,检测步骤包括用电化学传感器、光学传感器或光电传感器分析样品。

[0027] 在某些实施方案中,样品是体液例如血液、血清、血浆、脑脊髓液、尿、粘液或唾液。在其它实施方案中,样品是组织(例如,组织匀浆物)或细胞裂解物。在某些实施方案中,样品来自野生动物(例如,鹿或啮齿类动物例如小鼠、金花鼠、松鼠等)。在其它实施方案中,样品来自实验室动物(例如,样品来自实验室动物(例如,小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猴、灵长类动物等)。在其它实施方案中,样品来自驯养动物或野化家畜(例如,狗、猫、马)。在其它实施方案中,样品来自人。

[0028] 在另一个方面,本发明提供了诊断受试者的单核细胞埃里希体病的方法。在某些实施方案中,所述方法包括将来自受试者的样品与本发明的肽接触,和检测包含所述肽的抗体-肽复合物的形成,其中所述复合物的形成表明受试者患有单核细胞埃里希体病。在某些实施方案中,所述方法包括将样品与本发明的 2、3、4 或更多种不同肽的复合物接触。

[0029] 在某些实施方案中,肽或混合物中的每一种肽是分离的(例如,合成和 / 或纯化的)肽。在某些实施方案中,肽或不同肽的混合物被连接至或固定在固体支持物上。在某些实施方案中,固体支持物是珠粒(例如,胶粒、纳米颗粒、胶乳珠粒等)、侧流免疫测定装置中的流动通道(例如,多孔膜)、分析转头中的流动通道或管或孔(例如,在适用于 ELISA 测定的板中)。在某些实施方案中,固体支持物包括金属、玻璃、基于纤维素的材料(例如,硝酸纤维素)或聚合物(例如,聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚酯、尼龙、聚砒等)。在某些实施方案中,肽或不同肽的混合物被连接至树状聚合物和 / 或掺入 MAPS 体系。

[0030] 在某些实施方案中,检测步骤包括进行 ELISA 测定。在其它实施方案中,检测步骤包括进行侧流免疫测定。在其它实施方案中,检测步骤包括进行凝集测定。在其它实施方案中,检测步骤包括在分析转头中离心样品。在其它实施方案中,检测步骤包括用电化学传感器、光学传感器或光电传感器分析样品。

[0031] 在某些实施方案中,样品为体液例如血液、血清、血浆、脑脊髓液、尿或唾液。在其它实施方案中,样品为组织(例如,组织匀浆物)或细胞裂解物。在某些实施方案中,受试者为野生动物(例如,鹿或啮齿类动物,例如小鼠、金花鼠、松鼠等)。在其它实施方案中,受试者为实验室动物(例如,小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猴、灵长类动物等)。在其它实施方案中,受试者为驯养动物或野化家畜(例如,狗、猫、马)。在其它实施方案中,受试者为人。

[0032] 在另一个方面,本发明提供了试剂盒。在某些实施方案中,试剂盒包括本发明的肽。在某些实施方案中,试剂盒包括 2、3、4 或更多种不同的本发明的肽。所述肽可包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 的序列。在某些实施方案中,所述肽被连接至或固定在固体支持物上。例如,在某些实施方案中,固体支持物是珠粒(例如,胶粒、纳米颗粒、胶乳珠粒等)、侧流免疫测定装置中的流动通道、分析转头中的流动通道或管或孔(例如,在板中)。在某些实施方案中,肽被连接至树状聚合物和 / 或掺入 MAPS 体系。

[0033] 在某些实施方案中,试剂盒还包括珠粒群或板(例如,适用于 ELISA 测定的板)。在其它实施方案中,试剂盒还包括装置,例如侧流免疫测定装置、分析转头、电化学传感器、

光学传感器或光电传感器。在某些实施方案中,珠粒、板或装置群用于进行免疫测定。例如,在某些实施方案中,珠粒群、板或装置用于检测包含来自样品的抗体和本发明的肽的抗体-肽复合物的形成。在某些实施方案中,本发明的肽或不同肽的混合物被连接至或固定在珠粒、板或装置上。

[0034] 在某些实施方案中,试剂盒进一步包括说明书。例如,在某些实施方案中,试剂盒包括指示如何使用本发明的肽检测针对埃里希体属抗原的抗体或用于诊断单核细胞埃里希体病的说明书。在某些实施方案中,试剂盒包括指示如何使用珠粒群、板或装置(例如,包括本发明的肽或不同肽的混合物)检测针对埃里希体属抗原的抗体或诊断单核细胞埃里希体病。

[0035] 通过下面的详细描述,本发明的其它方面和实施方案将变得明显。

[0036] 附图简述

[0037] 图1是可用于检测针对埃里希体属抗原的抗体的间接夹心测定法的示意图。在此实施方案中,抗-人IgG/IgM或抗-狗IgG/IgM抗体被固定至测试位点上的适当基底(例如,硝酸纤维素膜)。测试样品中的抗体被固定的抗体结合。随后针对适当的埃里希体属抗原的测试样品抗体将结合本发明的肽。当本发明的肽被缀合至生物素时,可使用胶体金-标记链霉抗生物素蛋白来检测肽在测试位点上的存在。可以理解,可逆向操作间接夹心测定-即可将本发明的肽固定至基底以捕获测试样品中的抗-埃里希体属抗体,然后可将缀合至标记物(例如胶体金)的抗-人IgG/IgM或抗-狗IgG/IgM抗体用于检测与测试位点上固定的肽结合的抗体的存在。

[0038] 图2为基于图1的间接夹心测定法的侧流免疫测定装置的示意图。在侧流免疫测定装置的此实施方案中,将样品施加于加样垫上,随后流经缀合垫至测试膜。当样品通过缀合垫时,肽-生物素-链霉抗生物素-金复合物溶解,随后形成本发明的肽与适当的抗-埃里希体属抗原抗体之间的复合物。测试位点包含样品的适当抗-IgG或抗-IgM抗体,所述抗体结合样品中的所有抗体。例如蛋白L可用于替代抗-IgG或抗-IgM抗体。如果样品中充足的抗体已结合至本发明的肽,则阳性信号将出现在测试位点上。在侧流免疫测定装置的另一个实施方案中,本发明的肽被固定在测试位点(T)上并且缀合至可检测标记物(例如胶体金颗粒)的样品的适当的抗-IgG或抗-IgM抗体(例如抗-人或抗-犬)存在于缀合垫中。通过缀合垫的样品溶解标记抗体和存在于测试样品中的任何抗-埃里希体属抗原抗体,并且这类抗体复合物被测试位点上的本发明的固定的埃里希体属肽捕获,从而产生阳性信号。在任一实施方案中,所述装置还可包括在其上固定识别缀合垫中的标记肽或标记抗体的结合伴侣的对照位点(C)。

[0039] 图3为可用于检测针对埃里希体属抗原的抗体的双抗原夹心测定法的示意图。在此实施方案中,本发明的肽被固定至测试位点上的适当基底(例如,硝酸纤维素膜、ELISA板的孔)。测试样品中的抗体被本发明的固定的肽结合。针对适当埃里希体属抗原的测试样品抗体随后将结合被缀合至检测分子(例如,胶体金、辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(ALP))的本发明的第二组肽,所述检测分子检测与固定在测试位点上的第一组肽结合的抗体的存在。

[0040] 发明详述

[0041] 如本文中使用的,下列术语可具有下列含义:

[0042] 如本文中所用,术语“抗原”是指能够被抗体识别的分子。抗原可以是例如肽或其修饰形式。抗原可包括一个或多个表位。

[0043] 如本文中所用,术语“表位”是被抗体特异性识别的抗原部分。表位例如可包肽(例如,本发明的肽)的一部分含或由其组成。表位可以是线性表位、顺序表位或构象表位。

[0044] 术语“OMP-1 蛋白”是指埃里希体属的外膜蛋白 1 旁系同源物,包括但不限于犬埃里希体 (*E. canis*)P-30、犬埃里希体 P30-1、恰菲埃里希体 (*E. chaffeensis*)P28、恰菲埃里希体 OMP-1C、恰菲埃里希体 OMP-1D、恰菲埃里希体 OMP-1E 和恰菲埃里希体 OMP-1F。

[0045] 术语“核酸”、“寡核苷酸”和“多核苷酸”在本文中可互换使用并且包括 DNA、RNA、cDNA,无论是单链还是双链的,以及其化学修饰形式。

[0046] 本文中使用的单字母氨基酸缩写在本领域中具有其标准含义,并且本文中描述的所有肽序列根据本发明以 N 末端为左和以 C 末端为右来进行书写。

[0047] 其它术语将在后面的详细说明中按需要进行定义。

[0048] 组合物和装置

[0049] 本发明部分地基于这样的发现:埃里希体属 OMP-1 蛋白的片段的某些序列变体为针对多种埃里希体属的物种的抗体反应提供了稳健的检测。因此,在一个方面,本发明提供了能够结合识别埃里希体属抗原的抗体的肽。

[0050] 在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-T-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-G-L-K-Q-X_{18}-W-X_{20}-G-X_{22}-X_{23}-X_{24}-X_{25}-X_{26}-X_{27}-X_{28}-X_{29}-X_{30}-X_{31}-X_{32}-X_{33}-X_{34}-X_{35}-X_{36}-X_{37}-X_{38}-X_{39}-X_{40}$ (SEQ ID NO:1),其中除非另有指示,否则说明书通篇所使用的 SEQ ID NO:1 具有下列特征: X_1-X_6 和 $X_{27}-X_{40}$ 的每一个为任意氨基酸, X_7 为选自 N 和 Q 的氨基酸, X_8 为选自 T 和 P 的氨基酸, X_{10} 为选自 T 和 V 的氨基酸, X_{11} 为选自 G 和 A 的氨基酸, X_{12} 为选自 L 和 V 的氨基酸, X_{13} 为选自 Y 和 F 的氨基酸, X_{18} 为选自 D 和 N 的氨基酸, X_{20} 为选自 D 和 N 的氨基酸, X_{22} 为选自 S 和 V 的氨基酸, X_{23} 为选自 A、S 和 T 的氨基酸, X_{24} 为选自 A 和 I 的氨基酸, X_{25} 为选自 S、T 和 P 的氨基酸,以及 X_{26} 为选自 S、N 和 K 的氨基酸。

[0051] 在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 X_7 为 Q, X_{25} 为选自 T 和 P 的氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 X_7 为 N, 以及 X_{25} 为 S。在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 X_1 为选自 S 和 K 的氨基酸, X_2 为选自 A、V 和 R 的氨基酸, X_3 为选自 K 和 D 的氨基酸, X_4 为 E, X_5 为选自 E、D 和 N 的氨基酸, 以及 X_6 为选自 K 和 Q 的氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 X_1 为 S, X_2 为选自 A 和 V 的氨基酸, X_3 为 K, X_4 为 E, X_5 为选自 E 和 D 的氨基酸, 以及 X_6 为 K。在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 X_1-X_6 具有序列 K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO:2)。在某些实施方案中, $X_{27}-X_{40}$ 具有选自 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) 和 Q-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q (SEQ ID NO:6) 的序列。

[0052] 在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 X_1 为 S, X_2 为选自 A 和 V 的氨基酸, X_3 为 K, X_4 为 E, X_5 为选自 E 和 D 的氨基酸, X_6 为 K, X_7 为 Q, 且 X_{25} 为选自 T 和 P 的氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 X_1 为 S, X_2 为选自 A 和 V 的氨基酸, X_3 为 K, X_4 为 E, X_5 为选自 E 和 D 的氨基酸, X_6 为 K, X_7 为 N,

以及 X_{25} 为 S。在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 X_1 为 S, X_2 为选自 A 和 V 的氨基酸, X_3 为 K, X_4 为 E, X_5 为选自 E 和 D 的氨基酸, X_6 为 K, X_7 为 Q, X_{25} 为选自 T 和 P 的氨基酸,以及 $X_{27} - X_{40}$ 具有选自 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) 和 Q-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q (SEQ ID NO:6) 的序列。在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 X_1 为 S, X_2 为选自 A 和 V 的氨基酸, X_3 为 K, X_4 为 E, X_5 为选自 E 和 D 的氨基酸, X_6 为 K, X_7 为 N, X_{25} 为 S, 以及 $X_{27} - X_{40}$ 具有选自 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) 和 Q-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q (SEQ ID NO:6) 的序列。

[0053] 在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 $X_1 - X_6$ 具有序列 K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO:2), X_7 为 Q, 以及 X_{25} 为选自 T 和 P 的氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 $X_1 - X_6$ 具有序列 K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO:2), X_7 为 N, 以及 X_{25} 为 S。在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 $X_1 - X_6$ 具有序列 K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO:2), X_7 为 Q, X_{25} 为选自 T 和 P 的氨基酸, 以及 $X_{27} - X_{40}$ 具有选自 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) 和 Q-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q (SEQ ID NO:6) 的序列。在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 的序列,其中 $X_1 - X_6$ 具有序列 K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO:2), X_7 为 N, X_{25} 为 S, 以及 $X_{27} - X_{40}$ 具有选自 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) 和 Q-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q (SEQ ID NO:6) 的序列。

[0054] 在某些实施方案中,本发明的肽包含以下序列或由以下序列组成:S-A-K-E-E-K-Q-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); 或 S-A-K-E-E-K-Q-P-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:22)。在本段的任何实施方案中,肽的前 6 个氨基酸残基可用选自 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) 和 K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO:26) 的序列替代。在本段的任何实施方案中,肽的最后 14 个氨基酸残基可用选自 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) 和 Q-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q (SEQ ID NO:6) 的序列替代。

[0055] 在某些实施方案中,本发明的肽包含以下序列或由以下序列组成: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-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: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); 或 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)。在本段的任何实施方案中,肽的前 6 个氨基酸残基可用选自 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) 和 K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO:26) 的序列替代。

[0056] 在某些实施方案中,本发明的肽包含以下序列或由以下序列组成: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-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:57); 或 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)。在本段的任何实施方案中,肽的前 6 个氨基酸残基可用选自 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) 和 K-R-D-E-N-Q (SEQ ID NO:26) 的序列替代。在本段的任何实施方案中,肽的最后 14 个氨基酸残基可用选自 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) 和 Q-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q (SEQ ID NO:6) 的序列替代。

[0057] 在其它实施方案中,本发明的肽包含或由 SEQ ID NO:59 的序列 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) 组成,其中 X₅为选自 E 和 Q 的氨基酸,X₆为选自 E 和 Q 的氨基酸,X₇为任意氨基酸,X₁₁为选自 K 和 R 的氨基酸,X₁₂为任意氨基酸,X₁₆为选自 L 和 I 的氨基酸,X₁₇为任意氨基酸,X₁₈为选自 R 和 K 的氨基酸,X₁₉为选自 Q 和 N 的氨基酸,X₂₀为为选自 Y 和 T 的氨基酸,X₂₄为任意氨基酸,X₂₅为选自 I 和 L 的氨基酸,X₂₆为任意氨基酸,X₂₇为选自 E 和 E 的氨基酸,X₂₉为选自 E 和 Q 的氨基酸,X₃₁为选自 E 和 Q 的氨基酸,以及 X₃₃为选自 K 和 R 的氨基酸。

[0058] 在某些实施方案中,本发明的肽包含或由 SEQ ID NO:59 的序列组成,其中 X₅为 E, X₆为 E, X₁₆为 L, X₁₈为 K, X₂₀为 Y, X₂₅为 I, X₂₉为 Q, X₃₁为 Q, 以及 X₃₃为 K。在其它实施方案中,本发明的肽包含或由 SEQ ID NO:59 的序列组成,其中 X₇为 K, X₁₂为选自 K 和 R 的氨基酸,X₁₇为选自 E 和 D 的氨基酸,X₂₄为选自 K 和 D 的氨基酸,以及 X₂₆为选自 E 和 T 的氨基酸。

[0059] 在某些实施方案中,本发明的肽包含以下序列或由以下序列组成: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); 或 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)。

[0060] 在其它实施方案中,本发明的肽包含以下序列或由以下序列组成: 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-G-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-T-R-K-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: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-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: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); 或 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)。

[0061] 在一些实施方案中,本发明的肽包含或由 SEQ ID NO:92 的序列 $G-X_2-F-S-A-K-X_7-X_8-K-X_{10}-A-D-T-R-X_{15}-T-F-G-L-X_{20}-K-Q-T-D-G-A-X_{27}-I-X_{29}-E-N-X_{32}-V-X_{34}-N-X_{36}-F-T-I-S-N$ (SEQ ID NO:92) 组成,其中 X_2 为选自 D 和 N 的氨基酸, X_7 为选自 E 和 Q 的氨基酸, X_8 为选自 E 和 Q 的氨基酸, X_{10} 为任意氨基酸, X_{15} 为任意氨基酸, X_{20} 为任意氨基酸, X_{27} 为任意氨基酸, X_{29} 为任意氨基酸, X_{32} 为选自 E 和 Q 的氨基酸, X_{34} 为选自 E 和 Q 的氨基酸,以及 X_{36} 为选自 K 和 R 的氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含或由 SEQ ID NO:92 的序列组成,其中 X_2 为 N, X_7 为 E, X_8 为 E, X_{32} 为 Q, X_{34} 为 Q, 以及 X_{36} 为 K。在其它实施方案中,本发明的

肽包含或由 SEQ ID NO:93 的序列 DNQVQNKFTISNYSFKYEDNP (SEQ ID NO:93) 组成。

[0062] 在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 的序列以及额外的 N 末端肽序列 (例如, N 末端延伸)。额外的 N 末端序列可包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25 或更多个氨基酸。在某些实施方案中, N 末端肽序列具有约 5 至约 10、约 10 至约 15、约 15 至约 20、约 20 至约 25、约 25 至约 30、约 30 至约 40 或约 40 至约 50 个氨基酸的长度。在一个实施方案中, N 末端肽序列可以是 G-N 或 G-D。例如,在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:59 的序列和额外的 N 末端肽序列 G-N 或 G-D。额外的 N 末端肽序列可以是天然序列。如本文中所用,“天然”序列是来自天然存在的埃里希体属 OMP-1 序列的肽序列或其变体。在某些实施方案中,肽序列为天然存在的埃里希体属 OMP-1 序列的片段。肽序列可以例如来自 OMP-1 的保守或非保守区域。肽序列可包括例如表位,例如优势免疫表位或可被宿主 (例如,人、狗等) 免疫系统识别的任何其它表位。OMP-1 蛋白及其肽已描述于例如美国专利第 6,544,517 号、第 6,893,640 号、第 6,923,963 号、第 7,063,846 号和第 7,407,770 号、美国专利申请 2004/0265333 和第 2009/0075368 号以及欧洲专利第 1026949 号中,这些专利的内容以引用的方式并入本文。

[0063] 变异多肽与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7-22 和 SEQ ID NO:27-94 中显示的肽具有至少约 80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 的同一性并且也是本发明的多肽。序列同一性百分比具有本领域公认的意义并且存在许多测量两个多肽或多核苷酸序列之间的同一性的方法。参见,例如,Lesk 编著,Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, (1988); Smith 编著, Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Academic Press, New York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., Computer Analysis Of Sequence Data, Part I, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press, (1987) 以及 Gribskov & Devereux, Eds., Sequence Analysis Primer, M Stockton Press, New York, (1991)。用于比对多核苷酸或多肽的方法被编码在计算机程序中,包括 GCG 程序包 (Devereux 等, Nuc. Acids Res. 12:387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul 等, J Molec. Biol. 215:403 (1990)) 和 Bestfit 程序 (Wisconsin Sequence Analysis Package, 用于 Unix 的 8 版, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711), 其使用 Smith 和 Waterman 的局部同源性算法 (Adv. App. Math., 2:482-489 (1981))。例如,可使用采用 FASTA 算法的计算机程序 ALIGN, 对于仿射空位搜索 (affine gap search) 使用为 -12 的空位开放罚分 (gapopen penalty) 和为 -2 的空位拓展罚分 (gap extension penalty)。

[0064] 当使用任何序列比对程序确定特定序列例如是否与参照序列具有约 95% 的同一性时,将参数设定为在参照多核苷酸的全长范围内计算同一性百分比并和允许达到参照多核苷酸的核苷酸总数的 5% 的同一性中的空位。

[0065] 肽序列的变体可由本领域技术人员部分基于序列的已知性质来容易地确定。例如,变异肽可包括氨基酸置换 (例如,保守氨基酸置换) 和 / 或缺失 (例如,小的、单个氨基酸缺失、或包括 2、3、4、5、10、15、20 或更多个连续氨基酸的缺失)。因此,在某些实施方案中,天然肽序列的变体是与天然存在的序列相异在于 (i) 一个或多个 (例如,2、3、4、5、6 或更多个) 保守氨基酸置换, (ii) 1 个或多个 (例如,2、3、4、5、6 或多个) 氨基酸的缺失或 (iii) 其组合的序列。缺失的氨基酸可以是连续的或非连续的。保守氨基酸置换是在它们

的侧链和化学性质上相关的氨基酸的家族内发生的那些置换。这些包括例如 (1) 酸性氨基酸: 天冬氨酸、谷氨酸; (2) 碱性氨基酸: 赖氨酸、精氨酸、组氨酸; (3) 非极性氨基酸: 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸; (4) 不带电荷的极性氨基酸: 甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸; (5) 脂族氨基酸: 甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸, 丝氨酸和苏氨酸任选地被分别分类为脂肪族-羟基; (6) 芳族氨基酸: 苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸; (7) 酰胺氨基酸: 天冬酰胺、谷氨酰胺; 和 (9) 含硫氨基酸: 半胱氨酸和甲硫氨酸。参见, 例如, Biochemistry, 第 2 版, 编著: L. Stryer, W H Freeman 和 Co.: 1981。用于确认合适变异多肽的方法是传统和常规的方法。

[0066] 肽序列的变体包括先前定义的肽序列上的变异。例如, 包含已知表位的先前描述的肽序列可在一端或两端被延伸或缩短 (例如, 约 1-3 个氨基酸), 和 / 或 1、2、3、4 或更多个氨基酸可被保守氨基酸置换等。此外, 如果蛋白质的区域已被鉴定为包含目标表位, 则研究者可从原始未加工区域的终点“迁移”目标区域 (例如, 在任一方向上约 5 个氨基酸) 以最优活性。

[0067] 在某些实施方案中, 额外的 N 末端肽序列可包含或由另一个肽组成, 所述肽具有 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 的序列。因此, 在一些实施方案中, 本发明的肽可以是具有 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 的序列的多聚体。在其它实施方案中, N 末端肽序列是与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 的序列的 N 末端天然相邻的天然 OMP-1 肽序列。例如, 在一个实施方案中, 肽可包括 SEQ ID NO:94 的多聚体, $(KEEKAETRTKTFGLEKQYDGAKIEENQVQNKGGGGG)_N$, 其中 $N=1-10$ 。在其它实施方案中, 肽可任选地通过一个或多个连接氨基酸包括 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:92 或 SEQ ID NO:94 的序列的融合序列。例如, 在一个实施方案中, 肽可包括任选地通过一个或多个连接氨基酸 (例如甘氨酸残基) 连接至 SEQ ID NO:94 的 SEQ ID NO:1 的序列。在另一个实施方案中, 肽可包括任选地通过一个或多个连接氨基酸 (例如甘氨酸残基) 连接至 SEQ ID NO:92 的 SEQ ID NO:1 的序列。

[0068] 在某些实施方案中, 额外的 N 末端肽序列为非天然序列。如本文中所用, “非天然”序列是除天然 OMP-1 肽序列外的任何蛋白质序列, 无论是来自埃里希体属蛋白还是来自其它蛋白。在某些实施方案中, 额外的 N 末端肽序列包含埃里希体属表面抗原的表位。在某些实施方案中, 额外的 N 末端肽序列包括埃里希体属抗原例如 p38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200 或 HGE-3 的表位。已描述了对应于埃里希体属抗原的蛋白质和肽序列。参见, 例如, 美国专利 No. 6, 306, 402、6, 355, 777、7, 204, 992 和 7, 407, 770 以及 W02006/138509, 所述专利和公布的内容以引用的方式并入本文。还可使用来源于其它微生物的多肽或肽。

[0069] 在某些实施方案中, 额外的 N 末端肽序列是序列的组合。例如, 额外的 N 末端肽序列可包含天然序列、非天然序列或这类序列的任何组合 (例如, 两个或更多个天然序列、两个或更多个非天然序列或一个或多个天然序列与一个或多个非天然序列的组合)。

[0070] 在某些实施方案中, 本发明的肽包含由 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 定义的序列并且还包含额外的 C 末端序列。额外的 C 末端肽序列可包 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25 或更多个氨基酸。在某些实施方案中, 额外的 C 末端序

列具有约 5 至约 10、约 10 至约 15、约 15 至约 20、约 20 至约 25、约 25 至约 30、约 30 至约 40 或约 40 至约 50 个氨基酸的长度。额外的 C 末端肽序列可以是天然 OMP-1 序列。在某些实施方案中, C 末端肽序列为天然存在的埃里希体属 OMP-1 序列的片段。肽序列可以例如来自 OMP-1 的保守或非保守区域。肽序列可包含例如表位, 例如优势免疫表位或可被宿主(例如, 人、狗等) 免疫系统识别的任何其它表位。在某些实施方案中, 额外的 C 末端肽序列可包含或由另一个具有 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 的序列的肽组成。例如, 在某些实施方案中, 本发明的肽可以是各自具有 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 的序列的序列的多聚体。在其它实施方案中, 天然序列为与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 的序列的 C 末端天然相邻的 OMP-1 序列。

[0071] 在某些实施方案中, 额外的 C 末端肽序列为非天然序列。在某些实施方案中, 额外的 C 末端肽序列包含除 OMP-1 外的埃里希体属表面抗原的表位。在某些实施方案中, 额外 C 末端肽序列包含埃里希体属抗原例如 p38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200 或 HGE-3 的表位。还可使用来源于其它微生物的多肽或肽。

[0072] 在某些实施方案中, 额外的 C 末端肽序列是序列的组合。例如, 额外的 C 末端肽序列可包含天然、非天然序列或这类序列的任何组合(例如, 两个或更多个天然序列、两个或更多个非天然序列或一个或多个天然序列与一个或多个非天然序列的组合)。

[0073] 在某些实施方案中, 本发明的肽包含由 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 定义的序列并且还包含额外的 N 末端肽序列和额外的 C 末端肽序列。额外的 N 末端和 C 末端肽序列可是上文中所描述的。本发明的肽不由全长 OMP-1 蛋白组成。然而, 在某些实施方案中, 本发明的肽可包含全长 OMP-1 蛋白。在其它实施方案中, 本发明的肽不包含全长 OMP-1 蛋白。

[0074] 可设计包含额外的 N 末端和 / 或 C 末端肽序列的本发明的肽以用于在感染后早期(例如, 在感染发生后 1 至 2 周内) 诊断埃里希体属感染。例如, 在某些实施方案中, 额外的 N 末端和 / 或 C 末端肽序列包含与埃里希体属感染的早期阶段相关的抗原或表位。

[0075] 除了上述序列外, 额外的 N 末端和 C 末端序列还可包含或由柔性序列组成, 所述柔性序列经设计用以在免疫测定(例如, ELISA 测定、侧流免疫测定、凝集测定等) 中更好地呈递本发明的肽以进行检测。此类柔性序列可由本领域技术人员容易地鉴定。

[0076] 在某些实施方案中, 本发明的肽包含或由 25 或更多个(例如, 26、27、28、29 或更多个) 氨基酸残基组成。在某些实施方案中, 本发明的肽包含或由 30 或更多个(例如, 31、32、33、34 或更多个) 氨基酸残基组成。在某些实施方案中, 本发明的肽包含或由 35 或更多个(例如, 36、37、38、39 或更多个) 氨基酸残基。在某些实施方案中, 本发明的肽包含或由 40 或更多个(例如, 41、42、43、44 或更多个) 氨基酸残基。在某些实施方案中, 本发明的肽包含或由 45 或更多个(例如, 46、47、48、49 或更多个) 氨基酸残基。在某些实施方案中, 本发明的肽包含或由 50 或更多个(例如, 51、52、53、54 或更多个) 氨基酸残基。在某些实施方案中, 本发明的肽包含或由 55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 或更多个氨基酸残基组成。

[0077] 在某些实施方案中, 本发明的肽包含本文中描述的肽序列的表位。例如, 在某些实施方案中, 本发明的肽包含选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7 至 SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:27 至 SEQ ID NO:94 的序列的表位。

[0078] 在某些实施方案中, 本发明的肽包含本文中描述的肽序列的片段。例如, 在某些实

实施方案中,本发明的肽包含选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7 至 SEQ ID NO:22 以及 SEQ ID NO:27 至 SEQ ID NO:94 的序列的片段。片段的长度可以为例如至少 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 或 44 个氨基酸。片段可以是连续的或可包括一个或多个缺失(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个氨基酸残基的缺失)。在某些实施方案中,片段包括美国专利第 6,306,402 号、第 6,355,777 号、第 7,204,992 号或第 7,407,770 号或 W02006/138509 中所示的序列。在某些实施方案中,片段不由美国专利第 6,306,402 号、第 6,355,777 号、第 7,204,992 号和第 7,407,770 号以及 W02006/138509 的一个或多个中所示的序列组成。包含本文中描述的肽序列的片段的本发明的肽还可包含额外的 N 末端肽序列、额外的 C 末端肽序列或其组合。额外的 N 末端和 C 末端肽序列可为如上所述。

[0079] 包含额外 N 末端或 C 末端肽序列的本发明的肽还可包含连接肽(例如,SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:92 的肽或其片段)与额外的 N 末端或 C 末端肽序列的接头。接头可以是例如肽间隔区。这类间隔区可由例如约 1 至 5 个(例如,约 3 个)氨基酸残基,优选不带电荷的氨基酸例如脂肪族残基(例如甘氨酸或丙氨酸)组成。在一个实施方案中,间隔区是三联体甘氨酸间隔区。在另一个实施方案中,间隔区是三聚体丙氨酸间隔区。在另一个实施方案中,间隔区包含甘氨酸和丙氨酸残基。或者,接头可以是化学(即,非肽)接头。

[0080] 在某些实施方案中,本发明的肽通过合成化学(即,“合成肽”)产生。在其它实施方案中,本发明的肽通过生物产生(即,通过细胞机器例如核糖体)。在某些实施方案中,本发明的肽是分离的。如本文中所用,“分离的”肽是已合成或生物产生的并且随后至少部分地从用于产生所述肽的化学药品和/或细胞机器纯化的肽。在某些实施方案中,本发明的分离的肽是基本上纯化的。术语“基本上纯化的”,如本文中所用,是指分子例如肽,其大体上不含用于肽的合成的细胞材料(蛋白质、脂质、糖类、核酸等)、细胞培养基、化学前体、化学药品及其组合。基本上纯化的肽具有约 40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、2%、1% 或更少的用于肽的合成的细胞材料、细胞培养基、其它多肽、化学前体和/或化学药品。因此,大体上纯的分子例如肽,可以为按干重计至少约 60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 的目标分子。本发明的分离的肽可存在于水、缓冲液中或以待复水的干燥形式例如作为试剂盒的部分存在。本发明的分离的肽可以以药学上可接受的盐的形式存在。能够与本发明的肽形成盐的适当的酸和碱对于本领域技术人员而言是熟知的,并且包括无机和有机酸及碱。

[0081] 在某些实施方案中,亲和纯化本发明的肽。例如,在某些实施方案中,本发明的肽利用它们结合抗-埃里希体属抗体(例如,针对 OMP-1 蛋白和任选地其它埃里希体属抗原的抗体)的能力来纯化,通过将这类抗体与本发明的肽接触(以便肽-抗体复合物能够形成),洗涤肽-抗体复合物以除去杂质,然后从抗体洗脱肽来进行。抗体可以被例如连接至固体支持物。亲和纯化的方法对于本领域技术人员来而言是熟知的和常规的。

[0082] 在某些实施方案中,对本发明的肽进行修饰。可通过多种技术,例如通过用加热和/或去垢剂(例如,SDS)变性来修饰本发明的肽。或者,可通过与一种或多种其它部分结合来修饰本发明的肽。结合可以是共价或非共价的,并且可以是例如通过末端氨基酸接头例如赖氨酸或半胱氨酸、化学偶联剂或肽键。其它部分可以是例如配体、配体受体、融合伴侣、可检测标记物、酶或固定肽的基底。

[0083] 可将本发明的肽缀合至配体例如生物素（例如，通过半胱氨酸或赖氨酸残基）、脂质分子（例如，通过半胱氨酸残基）或载体蛋白（例如，血清白蛋白、免疫球蛋白 Fc 结构域，通过例如半胱氨酸或赖氨酸残基）。与配体例如生物素的连接对于将肽与配体受体例如抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、多聚链霉抗生物素蛋白（参见，例如 US2010/0081125 和 US 2010/0267166，两者以引用的方式并入本文）或中性抗生物素蛋白结合是有用的。抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、多聚链霉抗生物素蛋白或中性抗生物素蛋白又可连接至信号部分（signaling moiety）（例如，酶例如辣根过氧化物酶（HRP）或碱性磷酸酶，或可被可观察到的其它部分，例如胶体金或荧光部分）或固体基底（例如，Immobilon™或硝酸纤维素膜）。或者，可将本发明的肽与配体受体例如抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、多聚链霉抗生物素蛋白或中性抗生物素蛋白融合或连接，从而促进肽与对应的配体例如生物素和任何部分（例如，信号部分）或与其连接的固体基底的结合。其它配体-受体对的实例在本领域是熟知的并且可以类似方式使用。

[0084] 本发明的肽可与至融合伴侣（例如，肽或其它部分）融合，所述融合伴侣可用于改善纯化，以增强肽在宿主细胞中的表达，帮助检测、使肽稳定等。用于融合伴侣的适当化合物的实例包括载体蛋白质（例如，血清白蛋白、免疫球蛋白 Fc 结构域）、辣根过氧化物酶（HRP）、 β -半乳糖苷酶、谷胱甘肽 S- 转移酶、组氨酸标签等。融合可通过例如肽键来实现。例如，本发明的肽和融合伴侣可以是融合蛋白并且可在框内直接融合或可包含肽接头，如上文在额外的 N 末端和 C 末端肽序列的上下文中所述。

[0085] 此外，可修饰本发明的肽以包括任何已知化学基团或分子种类。这类修饰包括但不限于糖基化、乙酰化、酰化、ADP- 核糖基化、酰胺化、与聚乙二醇的共价连接（例如，PEG 化）、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 γ 羧化、GPI 锚形成、羟化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白酶解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化（selenoylation）、硫酸化、遍在蛋白化、利用脂肪酸的修饰、转运 RNA 介导的氨基酸至蛋白质的添加例如精氨酸酰化等。还可包含氨基酸的类似物（包括非天然氨基酸）和具有取代的连接。由本文中论述的任何序列组成的本发明的肽可通过任何论述的修饰来进行修饰。这类肽仍然由氨基酸“组成”。

[0086] 上文所示的修饰对于本领域技术人员而言是熟知的并且已十分详细地描述在科学文献中。几种特别常见的修饰例如糖基化、脂质连接、硫酸化、谷氨酸残基的 γ - 羧化、羟化和 ADP- 核糖基化描述于许多基础教科书中，例如 Proteins-Structure and Molecular Properties, 第 2 版, T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993)。可获得关于该主题的许多详细综述，例如由 Wold, F. 撰写的 Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York 1-12 (1983) ; Seifter 等 (1990) Meth. Enzymol. 182:626-646 和 Rattan 等 (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 663:48-62。

[0087] 在某些实施方案中，本发明的肽被连接至或固定在基底上，例如固体或半固体支持物。连接可以是共价或非共价连接，并且可通过与使得能够共价或非共价结合的肽连接的部分（例如对连接至载体、支持物或表面的组分具有高亲和力的部分）来促进。例如，肽

可与配体例如生物素连接,与表面连接的组分可以是对应的配体受体例如抗生物素蛋白。可在免疫测定过程中在添加含抗体的样品之前或之后,将肽连接至或固定在基底上。

[0088] 在某些实施方案中,基底为珠粒例如胶粒(例如,由金、银、铂、铜、金属复合材料、其它软金属制造的胶体纳米颗粒、核心-壳结构颗粒或中空金纳米球)或其它类型的颗粒(例如,磁珠或包含二氧化硅、乳胶、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚丙烯酸酯或 PVDF 的颗粒或纳米颗粒)。这类颗粒可以包含标记物(例如,比色、化学发光或荧光标记物)并且可在免疫测定过程用于使肽的定位可看。在某些实施方案中,本发明的肽的末端半胱氨酸用于将肽直接结合至从金、银、铂、铜、金属复合材料、其它软金属等制造的纳米颗粒。

[0089] 在某些实施方案中,基底为点印迹或侧流免疫测定装置中的流动通道。例如,肽可被连接至或固定多孔膜例如 PVDF 膜(例如, Immobilon™膜)、硝酸纤维素膜、聚乙烯膜、尼龙膜或相似类型的膜上。

[0090] 在某些实施方案中,基底为分析转头中的流动通道。在其它实施方案中,基底为管或孔例如适用于 ELISA 测定的板(例如,微量滴定板)中的孔。这类基底可包括玻璃、基于纤维素的材料、热塑性聚合物例如聚乙烯、聚丙烯或聚酯、由颗粒材料组成的烧结构(例如,玻璃或各种热塑性聚合物)或由硝酸纤维素、尼龙、聚砒等组成的浇铸膜薄膜。基底可以是聚乙烯的烧结细粒,通常称为多孔聚乙烯,例如,来自 Chromex Corporation(Albuquerque, NM) 的 0.2-15 微米多孔聚乙烯。所有这类基底材料可以以适当形状(例如薄膜、片或板)使用,或可将它们涂覆至或结合或层合至适当的惰性载体例如纸、玻璃、塑料薄膜或织物上。用于将肽固定在固相上的适当的方法包括离子、疏水、共价相互作用等。

[0091] 因此,在另一个方面,本发明提供了装置。在某些实施方案中,装置用于进行免疫测定。例如,在某些实施方案中,装置为侧流免疫测定装置。在其它实施方案中,装置为分析转头。在其它实施方案中,装置为斑点印迹。在其它实施方案中,装置为管或孔,例如适用于 ELISA 测定的板中的。在其它实施方案中,装置为电化学传感器、光学传感器、或光电传感器。

[0092] 在某些实施方案中,装置包含本发明的肽。在其它实施方案中,装置包含本发明的不同肽的混合物。例如,在某些实施方案中,装置包含 2、3、4 或更多种不同的本发明的肽。在某些实施方案中,肽或混合物中的每一种肽包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 的序列。在其它实施方案中,肽或混合物中的每一种肽包含 SEQ ID NO:1 的序列。在某些实施方案中,肽被连接至或固定在装置上。

[0093] 在另一个方面,本发明提供了包含一种或多种本发明的肽的组合物。例如,在某些实施方案中,本发明提供了包含含有 SEQ ID NO:1 的序列的肽或其混合物的组合物。在某些实施方案中,组合物包含 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 或更多种肽(例如,由 SEQ ID NO:1 定义的所有可能的肽)的混合物。在某些实施方案中,肽包含 N 末端和 / 或 C 末端添加和 / 或被修饰(例如,通过与一种或多种其它部分结合),如本文中所描述的。在某些实施方案中,肽包含相同 N 末端和 / 或 C 末端添加。在其它实施方案中,肽包含不同 N 末端和 / 或 C 末端添加。在其它实施方案中,本发明提供了包含含有 SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 的序列的肽或其混合物的组合物。在某些实施方案中,组合物包含 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 或更多种肽（例如，由 SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 定义的所有可能的肽）的混合物。

[0094] 在某些实施方案中，组合物包含一种或多种本发明的肽以及一种或多种额外的肽例如埃里希体属肽或抗原、来自一个或多个感染性埃里希体属的物种的肽或抗原，或来自单核细胞埃里希体病的一种或多种病原体的肽或抗原。埃里希体属肽或抗原可以是任何埃里希体属表面肽或抗原，或本文中描述的任何肽或抗原（例如，OMP-1、p38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200 或 HGE-3 蛋白的任何肽或抗原或其任何片段或表位。组合可包含各个肽或多肽的混合物（简单混合物），其可以以融合肽或多肽的形式存在（例如，多聚体肽），或肽可通过树状聚合物连接（例如，如在 MAPS 结构中）。本发明的肽可在其 N 末端或 C 末端融合至另一种合适的肽。可将两个或更多个拷贝的本发明的肽与另一种肽（单独地或与一个或多个额外的肽组合地）连接。可使用融合或未融合的肽或多肽的组合。在一个实施方案中，额外的肽包含来自埃里希体属肽或抗原、来自感染性埃里希体属的物种的肽或抗原或来自单核细胞埃里希体病的病原体的肽或抗原的 B 细胞和 / 或 T 细胞表位。

[0095] 在另一个方面，本发明提供了包含编码本发明的肽的序列的核酸。本发明的核酸包含少于完整微生物基因并且可以是单链或双链的。核酸可以是 RNA、DNA、cDNA、基因组 DNA、化学合成的 RNA 或 DNA 或其组合。核酸可经纯化而不含其它组分例如蛋白质、脂质和其它多核苷酸。例如，核酸可以是 50%、75%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 纯化的。本发明的核酸编码本文中描述的肽。在某些实施方案中，核酸分子编码具有 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7-22 或 SEQ ID NO:27-94 的序列或其组合的肽。本发明的核酸可包含其它核苷酸序列，例如编码接头、信号序列、TMPR 终止转移序列、跨膜结构域或用于蛋白质纯化的配体例如谷胱甘肽 S- 转移酶、组氨酸标签和葡萄球菌属的蛋白 A 的序列。

[0096] 可分离本发明的核酸。“分离的”核酸是不与与其天然连接的 5' 和 3' 侧翼基因组序列之一或两者直接紧接的核酸。分离的核酸可以是例如任何长度的重组 DNA 分子，只要天然地被发现在天然存在的基因组中紧密地侧翼连接重组 DNA 分子的核酸序列被除去或不存在。分离的核酸还包括非天然存在的核酸分子。本发明的核酸还可包含编码免疫原性肽的片段。本发明的核酸可编码全长多肽、肽片段以及变体或融合肽。

[0097] 本发明的核酸可以至少部分地从存在于例如来自被感染的个体的生物样品例如血液、血清、唾液、或组织中的核酸序列分离。核酸还可以例如使用自动合成仪在实验中合成。扩增法例如 PCR 可用于至少部分地从编码多肽的基因组 DNA 或 cDNA 扩增核酸。

[0098] 本发明的核酸可包含天然存在的多肽的编码序列或可编码非天然存在的改变的序列。若需要，可将核酸克隆入包含表达控制元件（包括例如，复制起始点、启动子、增强子或在宿主细胞中驱动本发明的多核苷酸表达的其它调控元件）的表达载体。表达载体可以是例如质粒例如 pBR322、pUC 或 ColE1，或腺病毒载体例如原病毒 2 型载体或 5 型载体。任选地，可使用其它载体，包括但不限于辛德毕斯病毒、猿猴病毒 40、甲病毒属载体、痘病毒载体以及巨细胞病毒和逆转录病毒载体例如鼠肉瘤病毒、小鼠乳腺癌病毒、Moloney 鼠白血病病毒和劳斯肉瘤病毒。还可使用微型染色体 (Minichromosome) 例如 MC 和 MC1、噬菌体、噬菌粒、酵母人工染色体、细菌人工染色体、病毒颗粒、病毒样颗粒、粘粒（已向其中插入了 λ 噬菌体 cos 位点的质粒）和复制子（能够在它们自己的控制下在细胞中复制的基因元件）。

[0099] 用于制备有效地连接至表达控制序列的多核苷酸和在宿主细胞中表达它们的方法在本领域是熟知的。参见例如,美国专利No. 4, 366, 246。当本发明的核酸位于邻近或接近一个或多个指导多核苷酸的转录和 / 或表达的表达控制元件时,所述核酸是有效连接的。

[0100] 因此,例如,本发明的肽可按常规基因工程技术重组产生。为了产生本发明的重组肽,将编码肽的核酸插入适当的表达载体。通常,构建重组分子或载体,其中编码选择的肽的多核苷酸序列被有效地连接至允许所述肽表达的表达控制序列。许多类型的适当的表达载体在本领域是已知的,包括例如包含细菌、病毒、酵母、真菌、昆虫或哺乳动物表达系统的载体。获得和使用这类表达载体的方法是熟知的。关于用于本发明的组合物或方法的该和其它分子生物学技术的指导,参见,例如, Sambrook 等, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, current edition, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Miller 等, *Genetic Engineering*, 8:277-298 (Plenum Press, 现行版本), Wu 等, *Methods in Gene Biotechnology* (CRC Press, New York, N. Y., 现行版本), *Recombinant Gene Expression Protocols*, in *Methods in Molecular Biology*, 第 62 卷, (Tuan 编著, Humana Press, Totowa, N. J., 现行版本) 和 *Current Protocols in Molecular Biology*, (Ausabel 等, Eds.), John Wiley & Sons, NY (现行版本) 以及其中引用的参考资料。

[0101] 因此,本发明还提供了包含本发明的核酸的载体,和包含这类载体的宿主细胞。在某些实施方案中,载体是穿梭载体。在其它实施方案中,载体是表达载体(例如,细菌或真菌表达载体)。在某些实施方案中,宿主细胞是细菌细胞。在其它实施方案中,宿主细胞是真核细胞。

[0102] 用于通过本方法进行本发明的重组核酸或载体转染的适当宿主或细胞系包括细菌细胞。例如,大肠杆菌 (*E. coli*) 的各种菌株(例如, HB101、MC1061) 众所周知为生物技术学领域的宿主细胞。枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 的各种菌株以及其它杆菌等也可用于该方法。或者,可使用常规方法在酵母、昆虫、哺乳动物或其它细胞类型中表达本发明的肽。

[0103] 本发明还提供了用于产生重组肽或多肽的方法,所述方法包括例如通过常规方法例如电穿孔用至少一种表达载体转染或转化宿主细胞,所述表达载体包含处于表达控制序列(例如,转录调控序列)的控制之下的本发明的多核苷酸。随后将转染或转化的宿主细胞在允许所述肽或多肽表达的条件下进行培养。回收、分离表达的肽或多肽,任选地通过对于本领域技术人员而言是已知的适当方法包括液相色谱(例如正相或反相)(使用 HPLC、FPLC 等)、亲和层析(例如利用无机配体或单克隆抗体)、大小排阻层析、固定金属螯合层析、凝胶电泳等从细胞(或从培养基,如果细胞外表达的话)纯化所述肽或多肽。本领域技术人员可在不背离本发明的范围的情况下选择最适当的分离和纯化技术。本领域技术人员可通过使用标准方法包括例如聚丙烯酰胺凝胶(例如, SDS-PAGE)、毛细管电泳、柱层析(例如,高效液相色谱(HPLC))或氨基-末端氨基酸分析来测定肽或多肽的纯度。

[0104] 方法

[0105] 在另一个方面,本发明提供了检测样品中的针对埃里希体属抗原的表位的抗体的方法。在某些实施方案中,所述方法包括将样品与本发明的肽接触,检测包含所述肽的抗体-肽复合物的形成,其中所述复合物形成表示针对埃里希体属抗原的表位的抗体存在于所述样品中。在某些实施方案中,埃里希体属抗原来自感染性埃里希体属的物种。在某些

实施方案中,埃里希体属抗原来自病原性埃里希体属的物种例如恰菲埃里希体和犬埃里希体。还可使用本发明的方法检测牵涉单核细胞埃里希体病的埃里希体属的其它物种,只要它们可诱导可与本发明的肽特异性反应的抗体。因此,应理解,术语“病原性埃里希体属”,如本文中所用,是指引发单核细胞埃里希体病的任何这样的埃里希体属的物种。

[0106] 在某些实施方案中,所述方法包括将样品与 2、3、4 或更多种(例如,5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、400、500 或更多种)不同的本发明的肽的混合物接触。在某些实施方案中,所述方法包括将样品与一种或多种本发明的肽和一种或多种其它肽(例如,埃里希体属肽或其抗原性片段或表位例如埃里希体属表面抗原或 OMP-1、p38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200 或 HGE-3 蛋白)的混合物接触。

[0107] 在某些实施方案中,肽或混合物中的每一种肽是分离的(例如,合成和/或纯化的)肽。在某些实施方案中,肽或肽的混合物被连接至或固定在固体支持物上。在某些实施方案中,固体支持物为珠粒(例如,胶粒、纳米颗粒、胶乳珠粒等)、侧流免疫测定装置中的流动通道(例如,多孔膜)、分析转头中的流动通道、管或孔(例如,在适用于 ELISA 测定的板中)或传感器(例如,电化学、光学或光电传感器)。

[0108] 在某些实施方案中,检测步骤包括进行 ELISA 测定。在其它实施方案中,检测步骤包括进行侧流免疫测定。在其它实施方案中,检测步骤包括进行凝集测定(例如,血凝集或颗粒/珠粒凝集测定)。在其它实施方案中,检测步骤包括在分析转头中离心样品。在其它实施方案中,检测步骤包括用电化学、光学或光电传感器分析样品。

[0109] 存在许多不同的用于检测包含本发明的肽的抗体-肽复合物的形成的常规测定法。例如,检测步骤可包括进行 ELISA 测定,进行侧流免疫测定,进行凝集测定,分析分析转头中的样品,或利用电化学、光学或光电传感器分析样品。这三种测定法在上文中进行了描述和/或对于本领域技术人员而言是熟知的。

[0110] 在一个实施方案中,所述方法包括检测天然存在的抗埃里希体属抗原(例如,病原性埃里希体属例如和恰菲埃里希体或犬埃里希体的抗原)抗体的存在,所述抗体由感染的受试者的免疫系统在其生物液体或组织中产生,并且能够与本发明的肽或本发明的肽的组合和任选地一种或多种适当的额外的抗原性多肽或肽特异性结合。

[0111] 适当的免疫测定法通常包括:接受或获得(例如,从患者)可能含有抗体的体液或组织的样品;将(例如,温育或反应)待测定的样品与本发明的肽在对于特异性肽-抗体复合物的形成是有效的条件下接触(例如,以进行肽与抗体的特异性结合);和测定接触的(反应的)样品的抗体-肽反应的存在(例如,测定抗体-肽复合物的量)。增加量的抗体-肽复合物的存在表示受试者暴露于并且感染了感染性埃里希体属的物种。“特异性结合”(例如,“特异于”或与……“特异性”结合)抗埃里希体属抗原抗体的肽,包括其修饰形式,与抗体相互作用,或以一定的量与其形成或经历物理结合并且进行足够的时间以允许检测抗体。所谓“特异性地”或“优先地”是指肽对于这样的抗体比对于样品中的其它抗体具有更高的亲和力(例如,更高的选择性程度)。例如,肽对于所述抗体与对于样品中的其它抗体相比较可具有至少约 1.5 倍、2 倍、2.5 倍、3 倍或更高的亲和力。这样的亲和力或特异性的程度可通过多种常规方法来测定,包括例如,竞争性结合研究。在 ELISA 测定中,阳性反应被定义为大于一组健康对照的平均值 2 或 3 个标准差。在一些实施方案中,需

要第二层次的测定 (second tier assay) 来提供明确的单核细胞埃里希体病的血清诊断。

[0112] 短语例如“含抗体的样品”或“检测样品中的抗体”不是指排除其中不含抗体或未检测到抗体的样品或测定 (例如, 检测尝试)。在一般意义上, 本发明包括确定响应感染性埃里希体属的感染而产生的抗体是否存在于样品中, 无论其是否被检测到。

[0113] 用于使肽与抗体反应以便它们特异性反应的条件对于本领域技术人员而言是熟知的。参见, 例如, *Current Protocols in Immunology* (Coligan 等, 编者, John Wiley & Sons, Inc)。

[0114] 所述方法包括接受或获得可能包含来自受试者的抗体的体液或组织的样品。抗体可具有例如 IgG、IgE、IgD、IgM 或 IgA 类型。一般地, IgM 和 / 或 IgA 抗体被检测到, 例如在感染的早期被检测到。当将某些上述其它肽 (例如, 用于鞭毛蛋白的检测的肽) 用于本方法时, 可检测到 IgG 抗体。样品优选易于获得并且可以是来源于静脉血样品或甚至来自手指刺扎的全血、血浆或血清。已知来自其它身体部分的组织或其它液体例如脑脊髓液 (CSF)、唾液、胃分泌物、粘液、尿等包含抗体, 从而可用作样品的来源。

[0115] 一旦允许肽抗原和样品抗体在适当的介质中反应, 则进行测定以确定抗体-肽反应的存在或不存在。在许多类型的适当测定法中, 对于本领域技术人员来部很明显的是免疫沉淀和凝集测定。

[0116] 在本发明的某些实施方案中, 测定包括: 固定样品中的抗体; 添加本发明的肽; 和检测抗体与肽结合的程度, 例如通过被标记的肽或通过添加标记物质例如标记结合伴侣 (例如, 链霉抗生物素蛋白-HRP 或链霉抗生物素蛋白-胶体金复合物) 或特异性识别所述肽的标记抗体。参见例如, 图 1。在其它实施方案中, 测定包括: 固定本发明的肽; 添加包含抗体的样品; 和检测与肽结合的抗体的量, 例如通过添加直接或间接缀合至标记物 (例如, 胶体金复合物、荧光标记物、酶 (例如, 辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)) 的本发明的另一种肽, 或通过添加标记物质例如特异性识别样品抗体 (例如, 抗-人 IgG 抗体、抗-人 IgM 抗体, 抗-狗 IgG 抗体、抗-狗 IgM 抗体、蛋白 A、蛋白 G、蛋白 L 或其组合等) 的结合伴侣或标记抗体来进行检测。参见例如, 图 3。在其它实施方案中, 测定包括: 将肽与包含抗体的样品反应 (无任何反应物被固定), 随后检测抗体与肽的复合物的量, 例如通过被标记的肽或通过添加标记物质, 例如标记结合伴侣 (例如, 链霉抗生物素蛋白-HRP 或链霉抗生物素蛋白-胶体金复合物) 或特异性识别所述肽的标记抗体来进行检测。

[0117] 本发明的肽的固定可以是共价或非共价的, 非共价固定可以是非特异性的 (例如, 在例如微量滴定孔中与聚苯乙烯表面的非特异性结合)。与固体或半固体载体、支持物或表面的特异性或半特异性结合可通过肽来实现, 所述肽具有使得其能够与固体或半固体载体、支持物或表面共价或非共价结合的部分或与该部分结合。例如, 所述部分可具有对连接至载体、支持物或表面的组分的亲和力。在该情况下, 所述部分可以是例如与肽的氨基酸基团例如 6-氨基己酸结合的生物素或生物素基或其类似物, 并且组分是抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白或其类似物。另一选择是其中所述部分具有氨基酸序列 His-His-His-His-His-His (SEQ ID NO:95) 并且载体包含带有 Ni^{++} 或 Co^{++} 离子的次氨基三乙酸 (NTA) 衍生物的情况。适当的载体、支持物和表面包括但不限于珠粒 (例如, 磁珠、胶粒或纳米颗粒例如胶体金或包含二氧化硅、乳胶、聚苯乙烯、聚碳酸酯或 PDVF 的颗粒或纳米颗粒)、共聚物例如苯乙烯-二乙烯基苯、羟基化苯乙烯-二乙烯基苯、聚苯乙烯、羧化

聚苯乙烯的胶乳、碳黑的珠粒、非活化的或聚苯乙烯或聚氯乙烯活化的玻璃、环氧-活化的多孔磁性玻璃、明胶或多糖颗粒或其它蛋白质颗粒、红细胞、单或多克隆抗体或这类抗体的 Fab 片段。

[0118] 用于使用抗原检测特异性抗体的免疫测定的方案在本领域是熟知的。例如,可使用常规夹心测定法,或可使用常规竞争性测定形式。关于一些适当类型的测定法的论述,参见 Current Protocols in Immunology (同上)。在某些实施方案中,在添加包含抗体的样品之前或之后,通过共价或非共价结合将本发明的肽固定在固体或半固体表面或载体上。

[0119] 用于进行特异性结合测定尤其是免疫测定的装置是已知的并且可容易地调节以适用于本方法。固相测定法通常比需要分离步骤,例如沉淀、离心、过滤、色谱或磁力的非匀相测定法 (heterogeneous assay method) 更容易进行,因为试剂的分离更快更简单。固相测定装置包括微量滴定板、流通测定 (flow-through assay) 装置 (例如,侧流免疫测定装置)、浸渍片和免疫毛细管 (immunecapillary) 或免疫色谱免疫测定 (immunochromatographic immunoassay) 装置。

[0120] 在本发明的实施方案中,固体或半固体表面或载体为微量滴定孔中的底或孔、滤纸表面或膜 (例如,硝酸纤维素膜或 PVDF (聚偏氟乙烯) 膜例如 Immobilon™ 膜)、中空纤维、珠粒色谱介质 (beaded chromatographic medium) (例如,琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶)、磁珠、纤维状纤维素基质、HPLC 基质、FPLC 基质、具有这样的尺寸的分子的物质 (所述尺寸可使具有与其结合的肽的分子,当溶解或分散在液相中时,可通过过滤器保留)、能够形成胶束或参与胶束的形成 (从而允许液相改变或交换而不夹带胶束的物质、水溶性聚合物或任何其它适当的载体、支持物或表面)。

[0121] 在本发明的某些实施方案中,给肽提供使得能够检测其的适当标记物。可使用能够单独地或与其它组合物或化合物协同地提供可检测信息的常规标记物。适当的标记物包括但不限于酶 (例如,HRP、 β -半乳糖苷酶等)、荧光标记物、放射性标记物和缀合有金属的标记物 (例如,缀合有胶体金的标记物)。适当的检测法包括例如,利用比色测定进行的被直接或间接标记的试剂的检测 (例如,用于 HRP 或 β -半乳糖苷酶活性的检测)、使用光学显微镜进行的目检、免疫荧光显微镜检查,包括共聚焦显微镜检查或利用流式细胞术 (FACS)、放射自显影术 (例如,用于放射性标记的试剂的检测)、电子显微镜检查、免疫染色、亚细胞分级分离等。在一个实施方案中,将放射性元素 (例如,放射性氨基酸) 直接掺入肽链;在另一个实施方案中,荧光标记物通过生物素 / 抗生物素蛋白相互作用,与缀合有荧光素的抗体结合等来与肽结合。在一个实施方案中,将抗体的可检测特异性结合伴侣添加至混合物中。例如,结合伴侣可以是可检测第二抗体或结合第一抗体的其它结合剂 (例如,蛋白 A、蛋白 G、蛋白 L)。该第二抗体或其它结合剂可以例如用放射性标记物、酶标记物、荧光标记物、发光标记物或其它可检测标记物例如抗生物素蛋白 / 生物素系统来标记。在另一个实施方案中,结合伴侣为本发明的肽,其可被直接或间接 (例如通过生物素 / 抗生物素蛋白相互作用) 缀合至酶例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。在这类实施方案中,可通过添加产生可检测信号的酶的底物例如生色底物、荧光生成底物或化学发光底物来产生可检测信号。

[0122] 如本文中所用,用于检测结合的肽的“检测系统”可以包括可检测结合伴侣,例如对肽具有特异性的抗体。在一个实施方案中,直接标记结合伴侣。在另一个实施方案中,将

结合伴侣连接至信号产生试剂例如酶,所述酶,在适当的底物存在的情况下,可产生可检测信号。用于固定肽的表面可任选地伴随检测系统。

[0123] 在本发明的实施方案中,检测方法包括目测抗体-肽复合物的颜色变化或检查抗体-肽复合物的物理-化学变化。物理-化学变化可随氧化还原反应或其它化学反应而发生。这些变化可通过眼睛,使用分光光度计等来检测。

[0124] 特别有用的测定形式为侧流免疫测定形式。针对人或动物(例如,狗、小鼠、鹿等)免疫球蛋白或葡萄球菌(staph)A、G或L蛋白的抗体可用信号产生物或报道分子(例如,胶体金)来标记,可在玻璃纤维垫(样品施加垫或缀合垫)上干燥和放置信号产生物或报道分子(例如,胶体金)。将诊断肽固定在膜例如硝酸纤维素或PVDF(聚偏氟乙烯)膜(例如,Immobilon™膜)上。当将样品的溶液(血液、血清等)施用于样品施加垫(或流过缀合垫)时,其可溶解标记报道分子,随后所述报道分子结合样品中的所有抗体。随后所得的复合物通过毛细管作用转运到下一个膜(含有诊断肽的PVDF或硝酸纤维素)中。如果抗诊断肽抗体存在,那么它们结合在膜成带的诊断肽,从而产生信号(例如,可看到或观察到的条带)。特异于标记抗体或第二标记抗体的其它抗体可用于产生对照信号。作为该测定形式的变型,可以以使样品中的抗体能够经过并且结合诊断条纹上的肽的方式将样品施用至样品施加垫,然后可将第二“显影剂”溶液添加至样品施加垫,其中显影剂溶液包含标记报道分子(或例如,溶解存在于样品施加垫或缀合垫中的标记报道分子)。随后显影剂溶液通过毛细管作用将标记报道分子运送至诊断条纹,在该处标记报道分子可结合与位于该诊断条纹上的肽结合的任何样品抗体

[0125] 用于侧流免疫测定的替代形式包括本发明的肽或组合物被缀合至配体(例如,生物素)和与标记的配体受体(例如,链霉抗生物素蛋白-胶体金)复合。可将标记肽复合物置于样品施加垫或缀合垫上。抗-人IgG/IgM或抗-动物(例如,狗、小鼠、鹿)IgG/IgM抗体或本发明的其它多肽被固定在测试位置(例如,检测线(test line))上的膜上,例如PVDF的硝酸纤维素。当将样品添加至样品施加垫时,样品中的抗体与标记的肽复合物反应,使得结合本发明的肽的抗体被间接标记。样品中的抗体随后通过毛细管被转运至下一个膜(含有诊断肽的PVDF或硝酸纤维素)并且结合固定的抗-人IgG/IgM或抗-动物IgG/IgM抗体(或蛋白A、蛋白G、蛋白L或其组合)或固定的本发明的肽。如果样品抗体的任何抗体结合本发明的标记肽,那么可在测试位点看到或观察到与所述肽结合的标记物。该类型的侧流装置的一个实施方案示于图2中。其中本发明的肽可用作测试位点上的固定捕获剂和与样品中的抗体反应的可溶性标记复合物的该类型的侧流装置的另一个实施方案示于图3中。用于该测定的适当的对照可包括例如定位在样品施加垫或缀合垫上的鸡IgY-胶体金缀合物,和固定在靠近测试位点的对照位点上的抗-鸡IgY抗体。还可修饰该形式以具有“显影剂(developer)”溶液。例如,显影剂溶液可包含(或溶解)标记的配体受体。

[0126] 用于筛选血液产物或其它生理学或生物学液体的另一种测定法是酶联免疫吸附测定法,即ELISA。通常,在ELISA中,本发明的分离的肽或组合物被直接或通过捕获基底(例如,抗体)吸附至微量滴定孔的表面。随后用适当的试剂例如牛血清白蛋白(BSA)、热灭活的正常山羊血清(NGS)或BLOTTO(也包含防腐剂、盐和消泡剂的脱脂奶粉的缓冲溶液)封闭表面上的残留的非特异性蛋白-结合位点。随后用怀疑包含特异性抗-埃里希体属(例如,抗-恰菲埃里希体或抗-犬埃里希体)抗体的生物样品温育孔。可单纯使用样

品,或更常见地将其通常稀释在包含少量(按重量计 0.1-5.0%)的蛋白质例如 BSA、NGS 或 BLOTTO 的缓冲液中。在温育足够长的时间以允许特异性结合发生后,洗涤孔以除去未结合的蛋白质,随后与最佳浓度的适当的抗-免疫球蛋白抗体(例如,用于人受试者,来自另一种动物例如狗、小鼠、牛等的抗-人免疫球蛋白(HuIg)),或通过标准方法缀合至酶或其它标记物并且溶解于封闭缓冲液中的本发明的另一种肽一起温育。标记物可选自多种酶包括辣根过氧化物酶(HRP)、 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等。进行足够的时间以允许特异性结合再次发生,随后再次洗涤孔以除去未结合的缀合物,然后添加酶的合适底物。进行显色,通过视觉或通过仪器(在适当的波长上测量)测定孔的内容物的光密度。截断 OD 值可定义为至少 50 个从个体(所述个体来自埃里希体病不是地方性的地区)收集的血清样品平均 OD+3 个标准差(SD)或通过其它这类常规定义来定义。在非常具体的测定的情况下,OD+2SD 可用作截断值。

[0127] 在 ELISA 的一个实施方案中,本发明的肽被固定在表面上,例如 96 孔 ELISA 板或或等同的固相,所述板或固相用链霉抗生物素蛋白或等同的生物素-结合化合物例如抗生物素蛋白或中性抗生物素蛋白以在碱性涂覆缓冲液中的最佳浓度进行涂覆并且在 4℃ 下温育过夜。在用标准洗涤缓冲液洗涤适当的次数后,将溶解在常规封闭缓冲液中的最佳浓度的本发明的肽或组合物的生物素化形式用于每一个孔。随后加入样品,如上进行测定。用于进行 ELISA 测定的条件在本领域是熟知的。

[0128] 用于 ELISA 测定的替代形式表征了连接(例如,融合)至适当的酶例如 HRP 的本发明的肽。用于进行这样的 ELISA 的步骤包括:用抗-狗或抗-人 IgG/IgM 涂覆板的孔;将怀疑包含针对本发明的肽的抗体的样品与固定的抗-种 IgG/IgM 一起温育;除去未反应的样品,用适当的洗涤缓冲液洗涤孔;施加酶-偶联的(例如,HRP-偶联的)本发明的肽,使其与任何捕获的抗-埃里希体属抗体反应;和通过应用适当的酶底物(例如,TMB)来使酶-偶联的肽可视。

[0129] 在另一个实施方案中,所述方法包括凝集测定法。例如,在某些实施方案中,将胶粒(例如,胶体金等)或胶乳珠粒缀至本发明的肽或组合物。随后,将生物液体与珠粒/肽缀合物一起温育,从而形成反应混合物。然后分析反应混合物以确定抗体的存在。在某些实施方案中,凝集测定法包括使用第二颗粒群例如胶粒(例如,胶体金等或胶乳珠粒,所述颗粒缀合至(1)特异于本发明的肽的抗体(在竞争性测定的情况下)或(2)能够检测样品抗体(例如,抗-人 IgG 或 IgM 抗体、抗-狗 IgG 或 IgM 抗体等)的抗体(在夹心测定的情况下)。适当的凝集法可包括离心作为评估凝集的程度手段。

[0130] 在其它实施方案中,本发明的肽或组合物被电印迹或斑点印迹到硝酸纤维素纸上。随后,将样品例如生物液体(例如,血清或血浆)与印迹的抗原一起温育,使生物液体中的抗体与所述抗原结合。结合的抗体随后可以例如通过标准免疫酶促法或通过使用偶联至第二抗体或其它抗体结合剂例如蛋白 A、蛋白 G、蛋白 L 或其组合的胶体纳米颗粒的可视化来进行检测。

[0131] 本领域技术人员应当理解,可设计许多常规蛋白质测定形式,特别是免疫测定形式来利用本发明的分离的肽检测受试者中的埃里希体属抗体和由病原性埃里希体属(例如,恰菲埃里希体或犬埃里希体引起的感染。因此本发明不受特定测定形式的选择限制,并且被认为包括本领域技术人员已知的测试形式。

[0132] 在某些实施方案中,用于所述方法的样品为体液例如血液、血清、脑脊髓液、尿或唾液。在其它实施方案中,样品是组织(例如,组织匀浆物)或细胞裂解物。在某些实施方案中,样品来自野生动物(例如,鹿或啮齿类动物,例如小鼠、金花鼠、松鼠等)。在其它实施方案中,样品来自实验室动物(例如,小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猴、灵长类动物等)。在其它实施方案中,样品来自驯养动物或野化家畜(例如,狗、猫、马)。在其它实施方案中,样品来自人。

[0133] 许多前述讨论涉及抗病原性埃里希体属的检测。然而,应理解,所述讨论还用于体外或体内检测已接触抗原的 T 细胞。

[0134] 预期产生细胞介导的免疫反应(例如,T-辅助细胞反应),因为产生了 IgG。因此预期可能测定已接触抗原的 T 细胞与本发明的肽之间的免疫反应性。在体外,这可通过用本发明的肽温育从受试者分离的 T 细胞,然后测量免疫反应性(例如通过测量随后 T 细胞的增殖或通过测量细胞因子例如 IFN- γ 从 T 细胞的释放)来进行。这类方法在本领域是熟知的。

[0135] 当在体内进行本发明的方法时,可使用许多种常规测定法。例如,可以以皮试的形式,例如通过在受试者中皮内注射本发明的肽来进行测定。在注射位置上的阳性皮肤反应表明受试者已暴露于并且感染了能够引起单核细胞埃里希体病的病原性埃里希体属,在注射位置上的阴性皮肤反应表明受试者未经历这样的暴露/感染。这样的测试或其它体内测试依赖于受试者的 T 细胞反应的检测。

[0136] 在另一个方面,本发明提供了诊断受试者的单核细胞埃里希体病方法。受试者可以是怀疑具有抗单核细胞埃里希体病的病原体的抗体的受试者。诊断方法对于诊断表现出单核细胞埃里希体病的临床症状的受试者是有用的。

[0137] 在某些实施方案中,所述方法包括将来自受试者的样品与本发明的肽接触,然后检测包含所述肽的抗体-肽复合物的形成,其中所述复合物的形成表明受试者患有埃里希体病。在某些实施方案中,所述方法包括将样品与本发明的 2、3、4 或更多种(例如,5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、400、500 或更多种)不同的肽的混合物接触。在某些实施方案中,所述方法包括将样品与一种或多种本发明的肽和一种或多种其它肽(例如,埃里希体属肽,或其抗原性片段或表位,例如来自埃里希体属表面蛋白或埃里希体属 OMP-1、p38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200 或 HGE-3 蛋白的)的混合物接触。

[0138] 在某些实施方案中,肽或混合物中的每一种肽是分离的(例如,合成和/或纯化的)肽。在某些实施方案中,肽或不同肽的混合物被连接至或固定在基底(例如,固体或半固体支持物)上。例如,在某些实施方案中,基底是珠粒(例如,胶体或其它类型的颗粒或纳米颗粒)、侧流免疫测定装置中的流动通道(例如,多孔膜)、分析转头中的流动通道或管或孔(例如,在适用于 ELISA 测定的板中)。

[0139] 存在许多不同的用于检测包含本发明的肽的抗体-肽复合物的形成的常规测定法。例如,检测步骤可包括进行 ELISA 测定,进行侧流免疫测定,进行凝集测定和在分析转头中分析样品,或利用电化学、光学或光电传感器分析样品。这样不同的测定法已在上文中进行了描述和/或对于本领域技术人员而言是熟知的。

[0140] 在某些实施方案中,样品为体液例如血液、血清、脑脊髓液、尿或唾液。在其它实施

方案中,样品为组织(例如,组织匀浆物)或细胞裂解物。在某些实施方案中,样品为野生动物(例如,鹿或啮齿类动物例如小鼠、金花鼠、松鼠等)。在其它实施方案中,受试者是实验室动物(例如,小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猴、灵长类动物等)。在其它实施方案中,受试者是驯养动物或野化家畜(例如,狗、猫、马)。在其它实施方案中,受试者为人。

[0141] 试剂盒

[0142] 在另一个方面,本发明提供了试剂盒。在某些实施方案中,试剂盒包括本发明的肽。在某些实施方案中,试剂盒包括 2、3、4 或更多种不同的本发明的肽。肽可包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO:92 的序列。在某些实施方案中,肽可被连接至或固定在固体支持物上。例如,在某些实施方案中,固体支持物是珠粒(例如,胶粒或纳米颗粒)、侧流免疫测定装置中的流动通道、分析转头中的流动通道或管或孔(例如,在板中)。

[0143] 还可在本发明的试剂盒中提供用于特定类型的测定的试剂。因此,试剂盒可包括珠粒群(例如,适用于凝集测定或侧流测定)或板(例如,适用于 ELISA 测定的板)。在其它实施方案中,试剂盒包括装置例如侧流免疫测定装置、分析转头或电化学、光学或光电传感器。珠粒、板和装置的群体用于进行免疫测定。例如,它们可用于检测包含来自样品的抗体和本发明的肽的抗体-肽复合物的形成。在某些实施方案中,本发明的肽、不同肽的混合物或本发明的肽组合物被连接至或固定在珠粒、板或装置上。

[0144] 此外,试剂盒可包括各种稀释剂和缓冲剂、标记缀合物或用于检测特异性结合的抗原或抗体的其它试剂以及其它信号产生试剂,例如酶底物、辅因子和色原。试剂盒的其它组分可由本领域技术人员容易地确定。这类组分可包括包衣试剂、特异于本发明的肽的多克隆或单克隆捕获抗体,或两种或更多种抗体的混合物、作为标准的这类抗原的纯化或半纯化的提取物、单克隆抗体检测器抗体、抗-小鼠、抗-狗、抗-鸡或抗-人抗体(具有缀合至其的指示剂分子)、用于比色法比较的指示剂图表、一次性手套、净化说明书(decontamination instruction)、敷药棒或容器、样品制备杯(sample preparatory cup)等。在一个实施方案中,试剂盒包括适用于构建允许肽-抗体复合物的形成的反应培养基的缓冲液或其它试剂。

[0145] 这类试剂盒为临床实验室提供了诊断由病原性埃里希体属例如恰菲埃里希体或犬埃里希体引起的感染的方便高效的方法。因此,在某些实施方案中,试剂盒还包括说明书。例如,在某些实施方案中,试剂盒包括显示如何使用本发明的肽检测针对埃里希体属抗原的抗体或诊断单核细胞埃里希体病的说明书。在某些实施方案中,试剂盒包括显示如何使用珠粒群、板或装置(例如,包括本发明的肽或不同肽的混合物)来检测针对埃里希体属抗原的抗体或或诊断单核细胞埃里希体病的说明书。

[0146] 本发明的肽、包含所述肽的组合物和装置、试剂盒和方法提供了许多优点。例如,它们允许单核细胞埃里希体病的简单、便宜、快速、灵敏和精确的检测并且避免与具有相似症状的其它病况的血清学交叉反应性。这允许准确的诊断。此外,本发明的诊断测试(例如,ELISA 测试、侧流免疫测定或凝集测定)在包含抗-Omp-1 抗体或响应基于埃里希体属的外表面蛋白的疫苗而产生的其它抗体的血清样品中是有用的。

[0147] 下列实施例说明本发明的不同方面。当然,这些实施例应当理解为仅说明本发明的仅某些实施方案并且不构成对本发明的范围的限制。

实施例

[0148] 实施例 1

[0149] 使用已知对于埃里希体属呈阳性或阴性的血清样品进行浸渍片测试。浸渍片由 2mm 宽的 HF180 硝酸纤维素 (具有 17mm CF6 上影线和包含连接至硝酸纤维素膜的 AIRM-2 肽的捕获线) 组成。AIRM-2 肽是各自具有 SEQ ID NO:1 的序列的生物素化的肽的混合物, 其通过链霉抗生物素蛋白被连接至膜。浸渍片的下半区用 PBS、1%BSA、1%Triton X-100, pH 7.4 的溶液封闭。

[0150] 最初, 连接至浸渍片的 AIRM-2 肽的量在 0.1mg/ml、0.5mg/ml 和 1.0mg/ml 之间变化, 对于每一种肽浓度, 肽: 链霉抗生物素蛋白的比率进一步在 1:1、1:4 和 1:8 之间变化。

[0151] 测试由如下步骤组成: 将每一张浸渍片置于包含 40 μ l TBS 的孔中, 使孔倾空 (洗涤步骤); 将 1 μ l 的样品斑滴在每一张浸渍片的封闭的下半区上; 将每一张浸渍片置于包含 40 μ l 的缀合物的孔中, 使孔倾空; 读取每一张浸渍片的捕获线上的任何信号。缀合物由在 OD1 或 OD2 上的缀合有金的兔抗-狗 IgG 组成。

[0152] 埃里希体属阳性样品 (R09266-007 (BH19)) 的结果示于表 1 和 2 中

[0153] 表 1

[0154]	OD1 缀合物 + 0.1 mg/ml AIRM-2		OD1 缀合物 + 0.5 mg/ml AIRM-2		OD1 缀合物 + 1.0 mg/ml AIRM-2	
	SA 比率	(Op1)	SA 比率	(Op1)	SA 比率	(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

[0155] 表 2

[0156]	OD2 缀合物 + 0.1 mg/ml AIRM-2		OD2 缀合物 + 0.5 mg/ml AIRM-2		OD2 缀合物 + 1.0 mg/ml AIRM-2	
	SA 比率	(Op1)	SA 比率	(Op1)	SA 比率	(Op1)
	1:1	10	1:1	8	1:1	11
[0157]	1:4	4	1:4	11	1:4	11
	1:8	11	1:8	11	1:8	5

[0158] 埃里希体属阴性样品 (R09266-008) 的对应结果全部为 0。虽然示于表 1 和 2 中的关于埃里希体属阳性样品的所有结果在捕获线上产生阳性信号, 但具有 1:4 或 1:8 比率的肽: 链霉抗生物素蛋白的 0.5mg/ml AIRM-2 肽似乎提供了用于进一步测试的最佳捕获条件。

[0159] 实施例 2

[0160] 按照实施例 1 的方法利用 0.5mg/ml AIRM-2 肽、1:4 的肽: 链霉抗生物素蛋白比率和 OD1 缀合物进行浸渍片测试, 测试一组埃里希体属阳性和阴性血清样品。结果示于表 3 中。

[0161] 表 3

[0162]

样品	浸渍片 1(0p1)	浸渍片 2(0p1)	平均值	标准差
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
阴性 :R09266-008	0	0	0	0
阴性 :疏螺旋体属样品 2	0	0	0	0
阴性 :疏螺旋体属 5	0	0	0	0
阴性 :疏螺旋体属 8	0	0	0	0
阴性 :疏螺旋体属 9	0	0	0	0
阴性 :疏螺旋体属 10	0	0	0	0

[0163]

样品	浸渍片 1(0p1)	浸渍片 2(0p1)	平均值	标准差
单独的缀合物	0	0	0	0

[0164] 表 3 的结果表明,在测试的条件下,所有埃里希体属阳性样品均被检测到具有 rann 10 的信号,而观察到埃里希体属阴性样品无假候阳性信号。

[0165] 实施例 3

[0166] 按照实施例 1 的方法进行浸渍检查法。分析用埃里希体属阴性 R09266-008 血清样品对埃里希体属阳性 BH19 血清样品进行的系列稀释。结果示于表 4 中。

[0167] 表 4

[0168]

稀释因子	浸渍片 1(0p1)	浸渍片 2(0p1)	浸渍片 3(0p1)	平均值	标准差
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

[0169] 如表 4 中所示,埃里希体属阴性血清对埃里希体属阳性血清的增加的稀释导致观察到的信号强度降低。这表明埃里希体属特异性信号是由于存在于阳性样品中的抗体而被检测到,而并非归因于基质干扰或其它非特异性结合而引起。

[0170] 实施例 4

[0171] 使用标准合成法合成两种不同的各自具有 SEQ ID NO:96 或 SEQ ID NO:97 的序列的生物素化的肽的混合物:

[0172] 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

[0173] 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

[0174] -E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N,其中 X₇、X₁₂、X₁₇、X₂₄和 X₂₆是任意氨基酸。

[0175] 每一种混合物是“X”位置上的所有天然 L-氨基酸的等摩尔混合物。将这两种肽混合物以 1mg/ml 各自溶解在蒸馏水中。加热至 40℃促进溶解。将商购的链霉抗生物素蛋白在室温下溶解于水中。使用 Tris 缓冲液将链霉抗生物素蛋白与单独的肽混合以产生终浓度 5 μg/ml 的链霉抗生物素蛋白和 2.5 μg/ml 的具有 SEQ ID NO:96 或 SEQ ID NO:97 的肽。

[0176] 将这样形成的链霉抗生物素蛋白-肽复合物用于涂覆 ELISA 板的孔。倒出未结合的混合物,将板封闭以防止不期望的非特异性结合。随后对于埃里希体属的物种呈阳性(如通过间接免疫荧光测定法测定的)的狗血清样品与包 SEQ ID NO:96 或 SEQ ID NO:97 的序列的肽反应。在 1 小时的温育后,除去未结合的材料,洗涤板。通过将结合的 IgG 与

(i) 山羊抗 - 狗 HRP 缀合物反应和 (ii) 利用商业 TMV 底物来使结合的 HRP 可见来实现狗 IgG 与孔的结合。

[0177] 发现两份狗血清样品与包含 SEQ ID NO:96 或 SEQ ID NO:97 的序列的肽的混合物反应但不与专门设计用以鉴定恰菲埃里希体的肽反应。类似地, 13 份狗血清样品与设计用于检测恰菲埃里希体的肽反应但不与包含 SEQ ID NO:96 或 SEQ ID NO:97 的肽反应。因此, 包含 SEQ ID NO:96 的肽、包含 SEQ ID NO:97 的肽和检测恰菲埃里希体的肽的组合能够检测具有针对埃里希体属的物种犬埃里希体、恰菲埃里希体和埃翁氏埃里希氏体 (ewingii.) 的抗体的所有动物。

[0178] 文献中通过引用并入的任何定义的程度与本文中提供的定义一致, 以本文中提供的定义为主。虽然已参考目前优选实施方案和前述非限定性实施例描述了本发明, 但应当理解, 可在不背离本发明的精神的情况下进行对于本领域技术人员显而易见的各种改变和变动。因此, 本发明仅受以下权利要求限定。

[0001]

序列表

<110> 爱贝斯股份有限公司

<120> 用于检测埃里希体属抗体的肽、装置和方法

<130> ABAX-036/Q1W0

<150> US 61/263,329

<151> 2009-11-20

<160> 97

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 40

<212> PRT

<213> Ehrlichia sp.

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(6)

<223> Xaa may be any amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa may be Asn or Gln

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa may be Thr or Pro

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa may be Thr or Val

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> Xaa may be Gly or Ala

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa may be Leu or Val

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Xaa may be Tyr or Phe

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> Xaa may be Asp or Asn

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Xaa may be Asp or Asn

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> Xaa may be Ser or Val

<220>

<221> misc_feature

[0002]

<222> (23)..(23)
 <223> Xaa may be Ala, Ser, or Thr

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa may be Ala or Ile

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa may be Ser, Thr, or Pro

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa may be Ser, Asn, or Lys

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(40)
 <223> Xaa may be any amino acid

 <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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40

 <210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

 <400> 2
 Lys Arg Asp Glu Asn Gln
 1 5

 <210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

 <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
 <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.

 <400> 5

[0003]

Ser Leu Asn Val Ser Phe Leu Ile Asp Pro Met Ala Pro Phe
1 5 10

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Ehrlichia sp.

<400> 6

Gln Asp Ser Asn Leu Tyr Ser Ser Ile Phe Phe Val Pro Gln
1 5 10

<210> 7
<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

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
35 40

<210> 8
<211> 40
<212> PRT
<213> Ehrlichia sp.

<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

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

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
35 40

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

[0004]

<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

<211> 40

<212> PRT

<213> Ehrlichia sp.

<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

<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

Ser Glu Thr Ser Pro Gly Gln Glu
 35 40

<210> 13

<211> 40

<212> PRT

<213> Ehrlichia sp.

<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

<210> 14

<211> 40

<212> PRT

<213> Ehrlichia sp.

<400> 14

[0005]

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

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

<400> 15

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
<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
<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
<213> Ehrlichia sp.

<400> 18

[0006]

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
<213> Ehrlichia sp.

<400> 19

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
<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
<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
<213> Ehrlichia sp.

<400> 22

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Val Gly Leu Tyr Gly Leu Lys

[0007]

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		
<213>	Ehrlichia sp.		
<400>	23		
Ser Val Lys Glu Glu Lys			
1	5		
<210>	24		
<211>	6		
<212>	PRT		
<213>	Ehrlichia sp.		
<400>	24		
Ser Ala Lys Glu Asp Lys			
1	5		
<210>	25		
<211>	6		
<212>	PRT		
<213>	Ehrlichia sp.		
<400>	25		
Ser Ala Lys Glu Glu Lys			
1	5		
<210>	26		
<211>	6		
<212>	PRT		
<213>	Ehrlichia sp.		
<400>	26		
Lys Arg Asp Glu Asn Gln			
1	5		
<210>	27		
<211>	40		
<212>	PRT		
<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
Ser Glu Thr	Ser Pro Gly Gln Glu		
	35	40	
<210>	28		
<211>	40		
<212>	PRT		

[0008]

<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
 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
 <210> 30
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.
 <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
 <210> 31
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.
 <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
 <210> 32
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

[0009]

<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

<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

<210> 34

<211> 40

<212> PRT

<213> Ehrlichia sp.

<400> 34

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro 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

<210> 35

<211> 40

<212> PRT

<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

<213> Ehrlichia sp.

[0010]

<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

<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

<213> Ehrlichia sp.

<400> 38

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

<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

<213> Ehrlichia sp.

<400> 40

[0011]

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
 <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
 <213> Ehrlichia sp.
 <400> 42

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
 <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
 <213> Ehrlichia sp.
 <400> 44

[0012]

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
<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
<213> Ehrlichia sp.

<400> 46

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro 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> 47
<211> 40
<212> PRT
<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

<210> 48
<211> 40
<212> PRT
<213> Ehrlichia sp.

<400> 48

Ser Ala Lys Glu Glu Lys Gln Pro Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Leu Lys

[0013]

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		
<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	
<210>	50		
<211>	40		
<212>	PRT		
<213>	Ehrlichia sp.		
<400>	50		
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		
<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		
<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

[0014]

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
<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
<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

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
<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
<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

[0015]

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
<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
<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.

<220>
<221> misc feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa may be Glu or Gln

<220>
<221> misc feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa may be Glu or Gln

<220>
<221> misc feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa may be any amino acid

<220>
<221> misc feature
<222> (11)..(11)
<223> Xaa may be Lys or Arg

<220>
<221> misc feature
<222> (12)..(12)
<223> Xaa may be any amino acid

[0016]

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> Xaa may be Leu or Ile

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> Xaa may be any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> Xaa may be Arg or Lys

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> Xaa may be Gln or Asn

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> Xaa may be Tyr or Thr

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> Xaa may be any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> Xaa may be Ile or Leu

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> Xaa may be any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> Xaa may be Asp or Glu

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> Xaa may be Glu or Gln

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> Xaa may be Glu or Gln

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(33)
<223> Xaa may be Lys or Arg
<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

```

[0017]

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

[0018]

<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

<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

<210> 66

<211> 38

<212> PRT

<213> Ehrlichia sp.

<400> 66

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

<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

<213> Ehrlichia sp.

[0019]

<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

<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

<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

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

<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

<213> Ehrlichia sp.

<400> 72

[0020]

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
<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
<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

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

<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.

<400> 76

[0021]

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.

<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.

<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 Thr 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.

<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

<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

[0022]

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> 81			
<211> 38			
<212> PRT			
<213> Ehrlichia sp.			
<400> 81			
Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Lys Thr Phe Gly Leu	5	10	15
1			
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		
<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	5	10	15
1			
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		
<210> 83			
<211> 38			
<212> PRT			
<213> Ehrlichia sp.			
<400> 83			
Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Lys Thr Phe Gly Leu	5	10	15
1			
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			
<213> Ehrlichia sp.			
<400> 84			
Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Ala Glu Thr Arg Arg Thr Phe Gly Leu	5	10	15
1			

[0023]

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.

<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.

<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 Glu 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.

<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

Lys Phe Thr Ile Ser Asn
35

<210> 88
<211> 38
<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

[0024]

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

<210> 89
<211> 38
<212> PRT
<213> Ehrlichia sp.

<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
<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

<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

<210> 92
<211> 41
<212> PRT
<213> Ehrlichia sp.

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa may be Asp or Asn.

[0025]

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa may be Glu or Gln

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa may be Glu or Gln

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa may be any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> Xaa may be any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> Xaa may be any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> Xaa may be any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> Xaa may be any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> Xaa may be Glu or Gln

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> Xaa may be Glu or Gln

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> Xaa may be Lys or Arg

<400> 92
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
<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

```

[0026]

<210> 94
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

 <220>
 <221> misc feature
 <222> (1)..(35)
 <223> May be repeated 1-10 times

 <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

 <210> 95
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> His tag sequence

 <400> 95
 His His His His His His
 1 5

 <210> 96
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia sp.

 <220>
 <221> misc feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa may be any amino acid

 <220>
 <221> misc feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa may be any amino acid

 <220>
 <221> misc feature
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa may be any amino acid

 <220>
 <221> misc feature
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa may be any amino acid

 <220>
 <221> misc feature
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa may be any amino acid

 <220>
 <221> misc feature
 <222> (1)..(38)
 <223> May be biotinylated

 <400> 96

[0027]

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa may be any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> Xaa may be any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> Xaa may be any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> Xaa may be any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> Xaa may be any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> May be biotinylated

<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

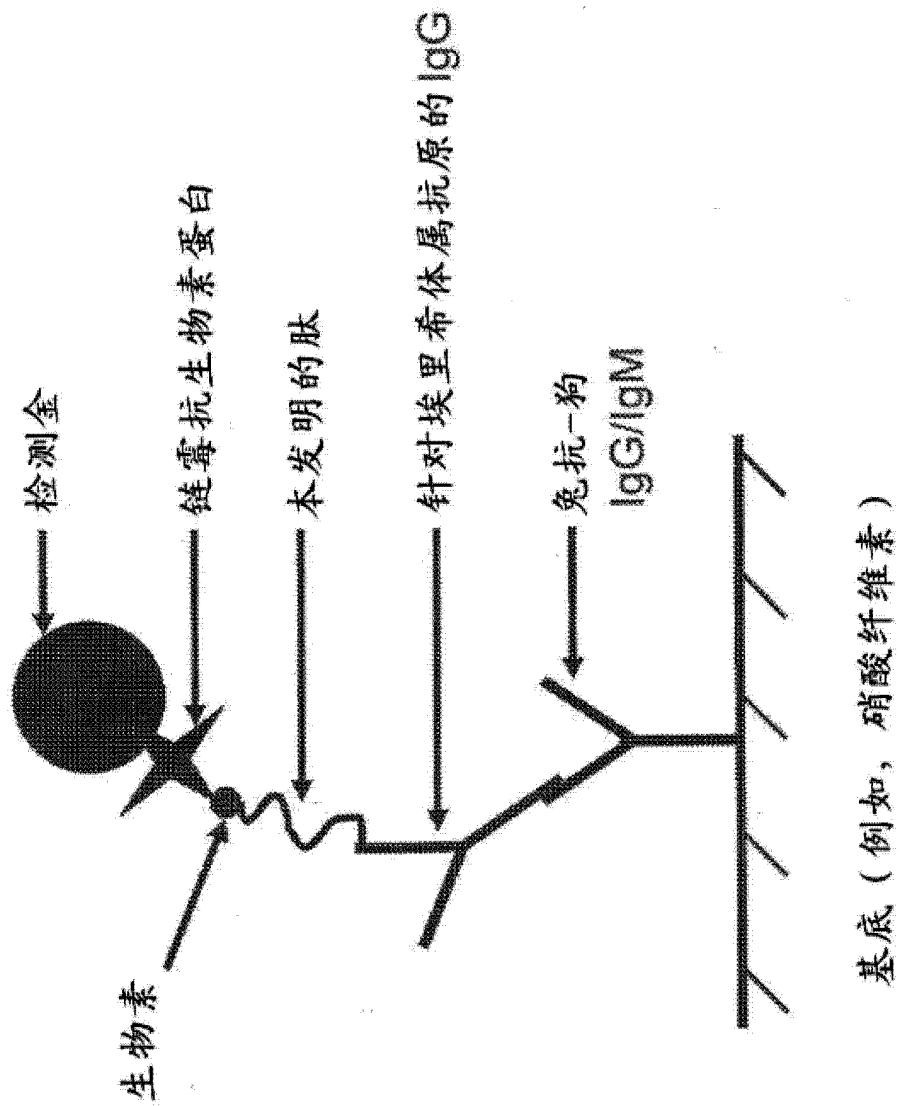


图 1

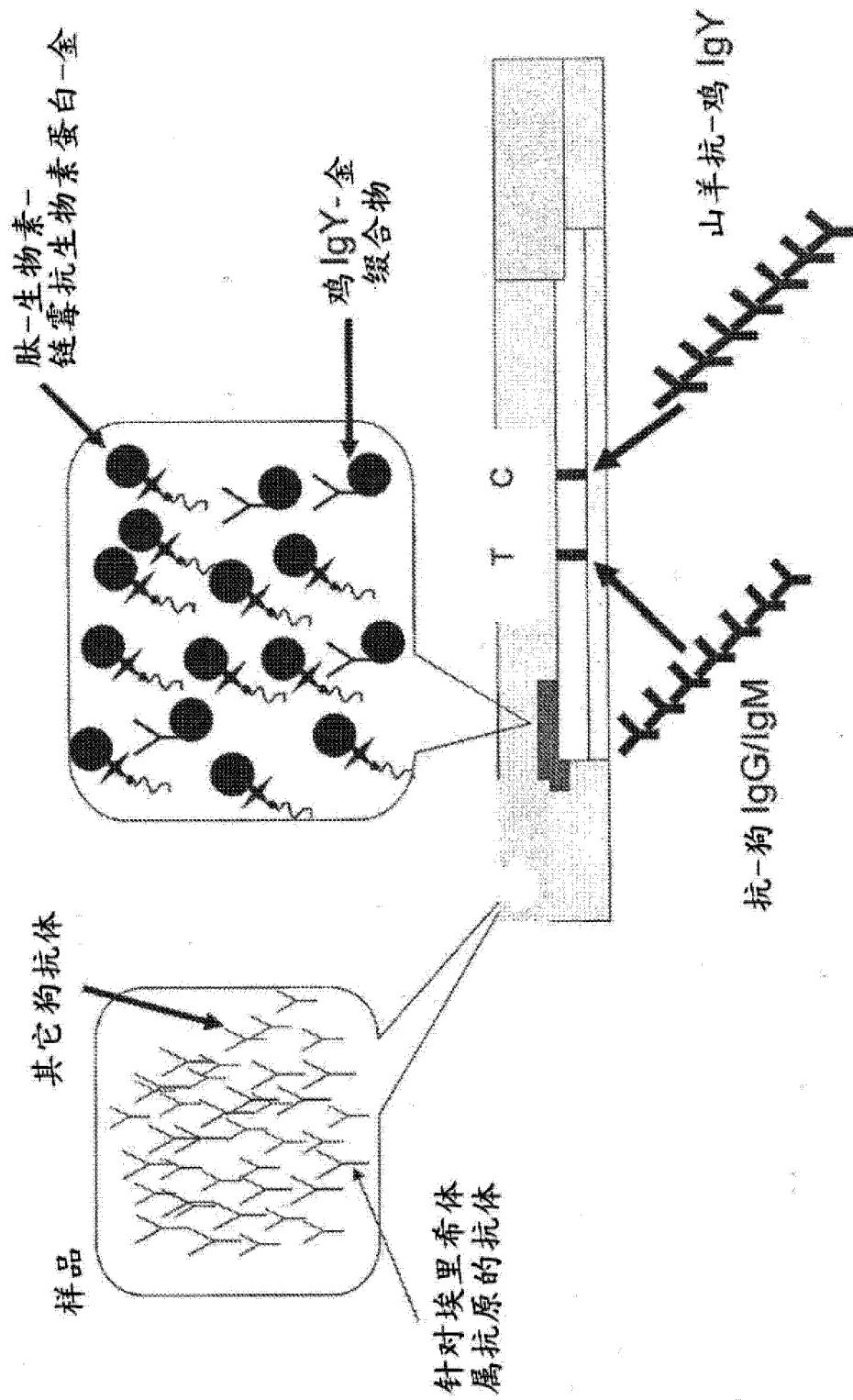


图 2

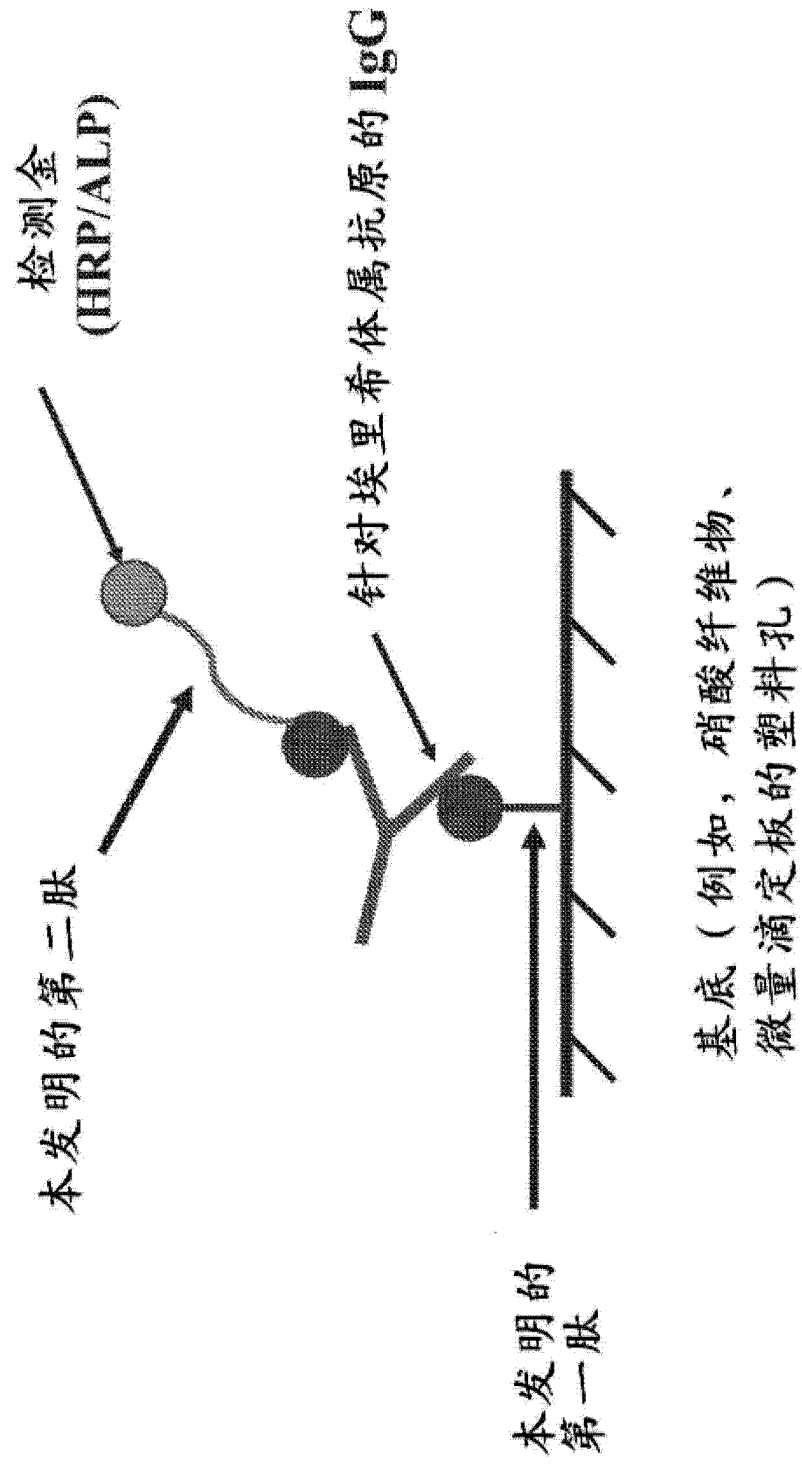


图 3

专利名称(译)	用于检测埃里希体属抗体的肽、装置和方法		
公开(公告)号	CN102834411B	公开(公告)日	2015-10-21
申请号	CN201080061669.1	申请日	2010-11-19
[标]申请(专利权)人(译)	爱贝斯股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	爱贝斯股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	爱贝斯股份有限公司		
[标]发明人	RK梅拉 KP阿伦 DM布莱利		
发明人	R·K·梅拉 K·P·阿伦 D·M·布莱利		
IPC分类号	C07K14/195 C07K19/00 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54306 C07K14/195 G01N33/54353 G01N33/54366 G01N33/56911 G01N2333/29		
代理人(译)	林晓红		
审查员(译)	贾涛		
优先权	61/263329 2009-11-20 US		
其他公开文献	CN102834411A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于检测结合埃里希体属抗原的抗体的组合物(例如, 肽组合物)。肽组合物包含基于埃里希体属外膜蛋白1(OMP-1)蛋白的免疫原性片段的多肽序列。本发明还提供了包含这类肽组合物和用于检测结合埃里希体属抗原的抗体和诊断单核细胞埃里希体病的装置、方法和试剂盒。

