



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0015455
(43) 공개일자 2014년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/115 (2010.01) *G01N 33/53* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7026658
(22) 출원일자(국제) 2012년03월09일
 심사청구일자 **없음**
(85) 번역문제출일자 2013년10월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/028632
(87) 국제공개번호 WO 2012/122540
 국제공개일자 2012년09월13일
(30) 우선권주장
 61/451,227 2011년03월10일 미국(US)

(71) 출원인
 소마로직, 임크.
 미국, 콜로라도 80301, 보울더, 월더니스 플레이스 2945
(72) 발명자
 오크스너, 엘스
 미국, 콜로라도 80220, 덴버, 아이비 스트리트 1953
 카탈리어스, 에발다스
 미국, 콜로라도 80027, 수피리어, 자로사 레인 2184
 잔치, 네보즈사
 미국, 콜로라도 80301, 보울더, 카터 트레일 6973
(74) 대리인
 조인제

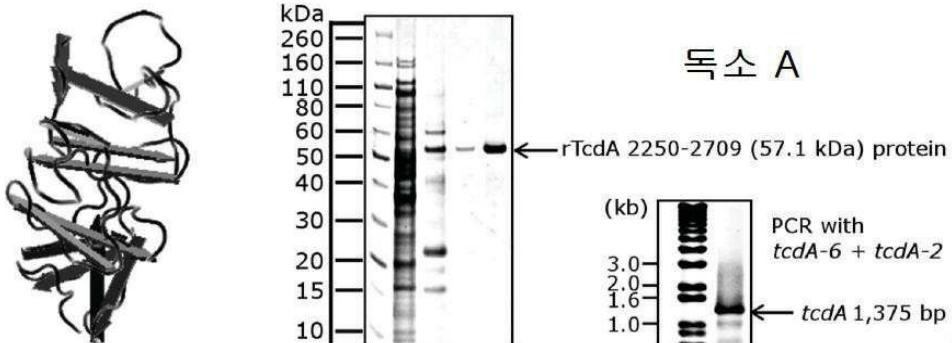
전체 청구항 수 : 총 85 항

(54) 발명의 명칭 **클로스트리디움 디피실 진단을 위한 암타머**

(57) 요 약

본 발명은 일반적으로 핵산 분야 및 더욱 특별하게는 클로스트리디움 디피실에 의해 생성되는 독소에 결합할 수 있는 암타머; 이와 같은 암타머를 포함하는 진단 키트 및 방법; 및 이와 같은 암타머를 만들고 사용하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

독소 A(toxin A), 독소 B(toxin B), 2성분 독소 A 사슬(binary toxin A chain) 및 2성분 독소 B 사슬(binary toxin B chain)으로부터 선택되는, 클로스트리디움 디피실(*Clostridium difficile*)에 의해 생성되는 독소에 결합하는 암타머(aptamer).

청구항 2

제1항에 있어서,

C-5 위치가 변경된 적어도 하나의 피리미딘을 포함하는 것을 특징으로 하는 암타머.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 C-5 위치가 변경된 적어도 하나의 피리미딘은 도 9에 나타낸 변경들 중 적어도 하나로부터 독립적으로 선택되는 C-5 변경을 포함하는 것을 특징으로 하는 암타머.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 C-5 위치가 변경된 적어도 하나의 피리미딘은 벤질카르복시아미드(benzylcarboxamide), 나프틸메틸카르복시아미드(naphthylmethylcarboxamide), 트립타미노카르복시아미드(triptaminocarboxamide), 티로실카르복시아미드(tyrosylcarboxamide), 2-나프틸메틸카르복시아미드(2-naphthylmethylecarboxamide) 및 페네틸-1-카르복시아미드(phenethyl-1-carboxamide)로부터 독립적으로 선택되는 C-5 변경을 포함하는 것을 특징으로 하는 암타머.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 암타머는 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경을 더 포함하며, 여기에서 상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 리보오스 위치(ribose position), 디옥시리보오스 위치(deoxyribose position), 포스페이트 위치(phosphate position) 및 염기 위치(base position)로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 위치에서의 화학적 치환인 것을 특징으로 하는 암타머.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 독립적으로 2'-위치 당 변경(2'-position sugar modification), 2'-아미노(2'-NH₂)(2'-amino(2'-NH₂)), 2'-플루오로(2'-F)(2'-fluoro(2'-F)), 2'-O-메틸(2'-OMe)(2'-O-methyl(2'-OMe)), 시토신 엑소시클릭 아민(cytosine exocyclic amine)에서의 변경, 5-브로모우라실(5-bromouracil)의 치환, 5-브로모디옥시우리딘(5-bromodeoxyuridine)의 치환, 5-브로모디옥시시티딘(5-bromodeoxycytidine)의 치환, 골격 변경(backbone modification), 메틸화(methylation), 3' 캡(3' cap) 및 5' 캡(5' cap)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 암타머.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 암타머는 30nM 이하의 클로스트리디움 디피실 독소 A에 대한 K_d를 포함하는 것을 특징으로 하는 암타머.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 암타머는 30nM 이하의 클로스트리디움 디피실 독소 B에 대한 K_d 를 포함하는 것을 특징으로 하는 암타머.

청구항 9

제4항에 있어서,

상기 암타머는 30nM 이하의 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 A 사슬에 대한 K_d 를 포함하는 것을 특징으로 하는 암타머.

청구항 10

제4항에 있어서,

상기 암타머는 30nM 이하의 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 B 사슬에 대한 K_d 를 포함하는 것을 특징으로 하는 암타머.

청구항 11

클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 결합하는 암타머와 시료를 접촉시키는 것을 포함하며, 여기에서 상기 독소는 독소 A, 독소 B, 2성분 독소 A 사슬 및 2성분 독소 B 사슬로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 시료에서 클로스트리디움 디피실 독소의 존재를 검출하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 암타머는 적어도 하나의 C-5 위치가 변경 피리미딘을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 적어도 하나의 C-5 위치가 변경 피리미딘은 도 9에 나타낸 변경들 중 적어도 하나로부터 독립적으로 선택되는 C-5 변경을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 적어도 하나의 C-5 위치가 변경 피리미딘은 벤질카르복시아미드, 나프틸메틸카르복시아미드, 트립타미노카르복시아미드, 티로실카르복시아미드, 2-나프틸메틸카르복시아미드 및 페네틸-1-카르복시아미드로부터 독립적으로 선택되는 C-5 변경을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 암타머는 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경을 더 포함하며, 여기에서 상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 리보오스 위치(ribose position), 디옥시리보오스 위치(deoxyribose position), 포스페이트 위치(phosphate position) 및 염기 위치(base position)로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 위치에서의 화학적 치환인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 독립적으로 2'-위치 당 변경(2'-position sugar modification), 2'-아미노(2'-NH₂)(2'-amino(2'-NH₂)), 2'-플루오로(2'-F)(2'-fluoro(2'-F)), 2'-0-메틸(2'-OMe)(2'-0-methyl(2'-OMe)), 시토신 엑소시클릭 아민(cytosine exocyclic amine)에서의 변경, 5-브로모우라실(5-

bromouracil)의 치환, 5-브로모디옥시우리딘(5-bromodeoxyuridine)의 치환, 5-브로모디옥시시티딘(5-bromodeoxycytidine)의 치환, 골격 변경(backbone modification), 메틸화(methylation), 3' 캡(3' cap) 및 5' 캡(5' cap)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제11항에 있어서,

상기 검출 방법은 풀-다운 검정법(pull-down assay), 점 블롯 검정법(dot blot assay), PCR 검정법(PCR assay) 또는 샌드위치 검정법(sandwich assay)로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

(a) 핵산의 후보 혼합물을 제조하는 것, 여기에서 상기 후보 혼합물은 후보 혼합물의 적어도 하나 또는 각각의 핵산에 하나, 여러 개의 또는 모든 피리미딘이 C-5 위치에 화학적 변경을 포함하는 변경된 핵산을 포함하며;

(b) 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소인 표적과 후보 혼합물을 접촉시키고 느린 오프 레이트(slow off-rate) 농축 과정(enrichment process)에 상기 후보 혼합물을 노출시키고, 여기에서 상기 후보 혼합물에 있는 다른 핵산과 관련된 표적으로부터 느린 해리 속도를 가지는 핵산은 표적과 결합하며, 핵산-표적 분자 복합체를 형성하는 것;

(c) 상기 후보 혼합물로부터 느린 오프-레이트 핵산을 분리하는 것; 및

(d) 표적 분자에 대한 느린 오프-레이트 암타머를 확인할 수 있는 느린 오프-레이트를 가지는 표적 분자에 결합할 수 있는 핵산 서열이 풍부한 핵산의 혼합물을 얻기 위하여 느린 오프-레이트 핵산을 증폭하는 것

을 포함하며, 여기에서 상기 독소는 독소 A, 독소 B, 2성분 독소 A 사슬 및 2성분 독소 B 사슬로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 결합하는 느린 오프-레이트 암타머를 확인 또는 생산하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 C-5 위치에서의 화학적 변경은 도 9에 나타낸 변경들 중 적어도 하나로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제18항에 있어서,

상기 C-5 위치에서의 화학적 변경은 벤질카르복시아미드(benzylcarboxamide), 나프틸메틸카르복시아미드(naphthylmethylcarboxamide), 트립타미노카르복시아미드(tryptaminocarboxamide), 티로실카르복시아미드(tyrosylcarboxamide), 2-나프틸메틸카르복시아미드(2-naphthylmethylecarboxamide) 및 폐네틸-1-카르복시아미드(pheneethyl-1-carboxamide)로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제18항에 있어서,

상기 암타머는 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경을 더 포함하며, 여기에서 상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 리보오스 위치(ribose position), 디옥시리보오스 위치(deoxyribose position), 포스페이트 위치(phosphate position) 및 염기 위치(base position)로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 위치에서의 화학적 치환인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 2'-위치 당 변경(2'-position sugar modification), 2'-아미노(2'-NH₂)(2'-amino(2'-NH₂)), 2'-플루오로(2'-F)(2'-fluoro(2'-F)), 2'-0-메틸(2'-OMe)(2'-0-methyl(2'-OMe),

시토신 엑소시클릭 아민(cytosine exocyclic amine)에서의 변경, 5-브로모우라실(5-bromouracil)의 치환, 5-브로모디옥시우리딘(5-bromodeoxyuridine)의 치환, 5-브로모디옥시시티딘(5-bromodeoxycytidine)의 치환, 골격변경(backbone modification), 메틸화(methylation), 3' 캡(3' cap) 및 5' 캡(5' cap)으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제18항에 있어서,

상기 느린 오프-레이트 농축 공정은 경쟁 분자(competitor molecule)와 후보 혼합물의 배양, 후보 혼합물의 희석 또는 경쟁 분자의 존재하에서 후보 혼합물의 희석으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

(a) 핵산의 후보 혼합물을 제조하는 것, 여기에서 상기 후보 혼합물은 후보 혼합물의 적어도 하나 또는 각각의 핵산에 하나, 여러 개의 또는 모든 피리미딘이 C-5 위치에 화학적 변경을 포함하는 변경된 핵산을 포함하며;

(b) 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소인 표적과 후보 혼합물을 접촉시키고 느린 오프 레이트 농축 과정에 상기 후보 혼합물을 노출시키고, 여기에서 후보 혼합물에 있는 다른 핵산과 관련된 표적으로부터 느린 해리 속도를 가지는 핵산은 표적과 결합하며, 핵산-표적 분자 복합체를 형성하는 것;

(c) 상기 후보 혼합물로부터 느린 오프-레이트 핵산을 분리하는 것;

(d) 표적 분자에 대한 느린 오프-레이트 암타머를 확인할 수 있는 느린 오프-레이트를 가지는 표적 분자에 결합할 수 있는 핵산 서열이 풍부한 핵산의 혼합물을 얻기 위하여 느린 오프-레이트 핵산을 증폭하는 것

을 포함하며, 여기에서 상기 독소는 독소 A, 독소 B, 2성분 독소 A 사슬 및 2성분 독소 B 사슬로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소로부터 느린 해리 속도를 가지는 암타머를 생산하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 C-5 위치에서의 화학적 변경은 도 9에 나타낸 변경들 중 적어도 하나로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제24항에 있어서,

상기 C-5 위치에서의 화학적 변경은 벤질카르복시아미드(benzylcarboxamide), 나프틸메틸카르복시아미드(naphthylmethylcarboxamide), 트립타미노카르복시아미드(tryptaminocarboxamide), 티로실카르복시아미드(tyrosylcarboxamide), 2-나프틸메틸카르복시아미드(2-naphthylmethylecarboxamide) 및 폐네틸-1-카르복시아미드(pheneethyl-1-carboxamide)로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제24항에 있어서,

상기 암타머는 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경을 더 포함하며, 여기에서 상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 리보오스 위치(ribose position), 디옥시리보오스 위치(deoxyribose position), 포스페이트 위치(phosphate position) 및 염기 위치(base position)로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 위치에서의 화학적 치환인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서,

상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 2'-위치 당 변경(2'-position sugar modification), 2'-아미노(2'-NH₂)(2'-amino(2'-NH₂)), 2'-플루오로(2'-F)(2'-fluoro(2'-F)), 2'-0-메틸(2'-OMe)(2'-0-methyl(2'-OMe)),

시토신 엑소시클릭 아민(cytosine exocyclic amine)에서의 변경, 5-브로모우라실(5-bromouracil)의 치환, 5-브로모디옥시우리딘(5-bromodeoxyuridine)의 치환, 5-브로모디옥시시티딘(5-bromodeoxycytidine)의 치환, 골격변경(backbone modification), 메틸화(methylation), 3' 캡(3' cap) 및 5' 캡(5' cap)으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제24항에 있어서,

상기 느린 오프-레이트 농축 공정은 경쟁 분자(competitor molecule)와 후보 혼합물의 배양, 후보 혼합물의 희석 또는 경쟁 분자의 존재하에서 후보 혼합물의 희석으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

(a) 변경된 핵산의 후보 혼합물을 제조하는 것, 여기에서 후보 혼합물은 후보 혼합물의 적어도 하나 또는 각각의 핵산에서 적어도 하나의 피리미딘이 C-5 위치에 화학적 변경을 포함하는 변경된 핵산을 포함하고;

(b) 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소인 표적과 후보 혼합물을 접촉시키고, 여기에서 후보 혼합물에서 다른 핵산에 관련된 표적 분자에 증가된 친화력을 가지는 핵산은 표적 분자에 결합하며, 핵산-표적 분자 혼합체를 형성하는 것;

(c) 후보 혼합물의 잔여물로부터 증가된 친화력의 핵산을 분리하는 것; 및

(d) 증가된 친화력으로 표적 분자에 결합할 수 있고 뉴클레아제 저항성인 핵산 서열이 풍부한 핵산 혼합물을 얻기 위하여 증가된 친화력의 핵산을 증폭시켜 표적 분자에 대한 뉴클레아제 저항성 암타머를 확인하는 것

을 포함하는 과정에 의해 확인되는 핵산 서열에 기초하여 상기 뉴클레아제 저항성 암타머를 제조하거나 합성하는 것을 포함하며, 여기에서 상기 독소는 독소 A, 독소 B, 2성분 독소 A 사슬 및 2성분 독소 B 사슬로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 결합하는 뉴클레아제 저항성 암타머를 생산하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 C-5 위치에서의 화학적 변경은 도 9에 나타낸 변경들 중 적어도 하나로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제30항에 있어서,

상기 C-5 위치에서의 화학적 변경은 벤질카르복시아미드(benzylcarboxamide), 나프틸메틸카르복시아미드(naphthylmethylcarboxamide), 트립타미노카르복시아미드(triptaminocarboxamide), 티로실카르복시아미드(tyrosylcarboxamide), 2-나프틸메틸카르복시아미드(2-naphthylmethylecarboxamide) 및 폐네틸-1-카르복시아미드(phenethyl-1-carboxamide)로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제30항에 있어서,

상기 암타머는 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경을 더 포함하며, 여기에서 상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 리보오스 위치(ribose position), 디옥시리보오스 위치(deoxyribose position), 포스페이트 위치(phosphate position) 및 염기 위치(base position)로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 위치에서의 화학적 치환인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제30항에 있어서,

상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 2'-위치 당 변경(2'-position sugar modification), 2'-아미노

(2'-NH₂)(2'-amino(2'-NH₂)), 2'-플루오로(2'-F)(2'-fluoro(2'-F)), 2'-0-메틸(2'-OMe)(2'-0-methyl(2'-OMe)), 시토신 엑소시클릭 아민(cytosine exocyclic amine)에서의 변경, 5-브로모우라실(5-bromouracil)의 치환, 5-브로모디옥시우리딘(5-bromodeoxyuridine)의 치환, 5-브로모디옥시시티딘(5-bromodeoxycytidine)의 치환, 골격 변경(backbone modification), 메틸화(methylation), 3' 캡(3' cap) 및 5' 캡(5' cap)으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

- (a) 변경된 핵산의 후보 혼합물을 제조하는 것, 여기에서 후보 혼합물은 후보 혼합물의 적어도 하나 또는 각각의 핵산에서 적어도 하나의 퍼리미딘이 C-5 위치에 화학적 변경을 포함하는 변경된 핵산을 포함하고;
- (b) 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소인 표적과 후보 혼합물을 접촉시키고, 여기에서 후보 혼합물에서 다른 핵산에 관련된 표적 분자에 증가된 친화력을 가지는 핵산은 표적 분자에 결합하며, 핵산-표적 분자 혼합체를 형성하는 것;
- (c) 후보 혼합물의 잔여물로부터 증가된 친화력의 핵산을 분리하는 것; 및
- (d) 증가된 친화력으로 표적 분자에 결합할 수 있고 뉴클레아제 저항성인 핵산 서열이 풍부한 핵산 혼합물을 얻기 위하여 증가된 친화력의 핵산을 증폭시켜 표적 분자에 대한 뉴클레아제 저항성 암타미를 생산하는 것

을 포함하는 과정에 의해 확인되는 핵산 서열에 기초하여 상기 뉴클레아제 저항성 암타미를 제조하거나 합성하는 방법에 의해 제조되며, 여기에서 상기 독소는 독소 A, 독소 B, 2성분 독소 A 사슬 및 2성분 독소 B 사슬로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 결합하는 뉴클레아제 저항성 암타미.

청구항 36

제35항에 있어서,

상기 C-5 위치에서의 화학적 변경은 도 9에 나타낸 변경들 중 적어도 하나로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 뉴클레아제 저항성 암타미.

청구항 37

제35항에 있어서,

상기 C-5 위치에서의 화학적 변경은 벤질카르복시아미드(benzylcarboxamide), 나프틸메틸카르복시아미드(naphthylmethylcarboxamide), 트립타미노카르복시아미드(triptaminocarboxamide), 티로실카르복시아미드(tyrosylcarboxamide), 2-나프틸메틸카르복시아미드(2-naphthylmethylecarboxamide) 및 페네틸-1-카르복시아미드(phenethyl-1-carboxamide)로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 뉴클레아제 저항성 암타미.

청구항 38

제35항에 있어서,

상기 암타미는 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경을 더 포함하며, 여기에서 상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 리보오스 위치(ribose position), 디옥시리보오스 위치(deoxyribose position), 포스페이트 위치(phosphate position) 및 염기 위치(base position)로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 위치에서의 화학적 치환인 것을 특징으로 하는 뉴클레아제 저항성 암타미.

청구항 39

제38항에 있어서,

상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 2'-위치 당 변경(2'-position sugar modification), 2'-아미노(2'-NH₂)(2'-amino(2'-NH₂)), 2'-플루오로(2'-F)(2'-fluoro(2'-F)), 2'-0-메틸(2'-OMe)(2'-0-methyl(2'-OMe)), 시토신 엑소시클릭 아민(cytosine exocyclic amine)에서의 변경, 5-브로모우라실(5-bromouracil)의 치환, 5-브로모디옥시우리딘(5-bromodeoxyuridine)의 치환, 5-브로모디옥시시티딘(5-bromodeoxycytidine)의 치환, 골격 변경(backbone modification), 메틸화(methylation), 3' 캡(3' cap) 및 5' 캡(5' cap)으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 뉴클레아제 저항성 암타머.

청구항 40

SEQ ID NOS: 1-4, 6-10, 12-14, 16-22, 24-27 또는 29-31 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 암타머.

청구항 41

SEQ ID NOS: 33-46, 48-65, 67-74, 76-82, 84-89, 91-94, 96-97 또는 99-108 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 암타머.

청구항 42

SEQ ID NOS: 109, 111-123, 126-133, 135-138, 140-144 또는 146-150 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 암타머.

청구항 43

SEQ ID NOS: 153-156, 158-162 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 암타머.

청구항 44

SEQ ID NOS: 1-4, 6-10, 12-14, 16-22, 24-27 또는 29-31 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 암타머와 시료를 접촉시키는 것을 포함하는, 시료에서 클로스트리디움 디피실 독소 A의 존재를 검출하는 방법.

청구항 45

제44항에 있어서,

상기 검출 방법은 풀-다운 검정법(pull-down assay), 점 블롯 검정법(dot blot assay), PCR 검정법(PCR assay) 또는 샌드위치 검정법(sandwich assay)로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서,

상기 샌드위치 검정법은 암타머-표적-항체 검정법이며, 여기에서 상기 암타머는 기질 상에 고정화되어 있으며, 상기 항체는 고정화된 암타머에 결합된 표적을 검출하는데 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47

제45항에 있어서,

상기 샌드위치 검정법은 항체-표적-암타머 검정법이며, 여기에서 상기 항체는 기질 상에 고정화되어 있으며, 상기 암타머는 고정화된 항체에 결합된 표적을 검출하는데 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48

제45항에 있어서,

상기 샌드위치 검정법은 암타머-표적-암타머 검정법이며, 여기에서 제1 암타머는 기질 상에 고정화되어 있으며, 제2 암타머는 제1의 고정화된 암타머에 결합된 표적을 검출하는데 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 49

제45항에 있어서,

상기 검출 방법은 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소의 정량적 측정을 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50

SEQ ID NOS: 33-46, 48-65-67-74, 76-82, 84-89, 91-94, 96-97 또는 99-108 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 암타мер와 시료를 접촉시키는 것을 포함하는, 시료에서 클로스트리디움 디피실 독소 B의 존재를 검출하는 방법.

청구항 51

제50항에 있어서,

상기 검출 방법은 풀-다운 검정법(pull-down assay), 점 블롯 검정법(dot blot assay), PCR 검정법(PCR assay) 또는 샌드위치 검정법(sandwich assay)로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52

제51항에 있어서,

상기 샌드위치 검정법은 암타мер-표적-항체 검정법이며, 여기에서 상기 암타머는 기질 상에 고정화되어 있으며, 상기 항체는 고정화된 암타머에 결합된 표적을 검출하는데 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53

제51항에 있어서,

상기 샌드위치 검정법은 항체-표적-암타머 검정법이며, 여기에서 상기 항체는 기질 상에 고정화되어 있으며, 상기 암타머는 고정화된 항체에 결합된 표적을 검출하는데 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54

제51항에 있어서,

상기 샌드위치 검정법은 암타머-표적-암타머 검정법이며, 여기에서 제1 암타머는 기질 상에 고정화되어 있으며, 제2 암타머는 제1의 고정화된 암타머에 결합된 표적을 검출하는데 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55

제51항에 있어서,

상기 검출 방법은 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소의 정량적 측정을 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56

SEQ ID NOS: 109, 111-123, 126-133, 135-138, 140-144 또는 146-150 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 암타머와 시료를 접촉시키는 것을 포함하는, 시료에서 클로스트리디움 디피실 독소 A의 존재를 검출하는 방법.

청구항 57

제56항에 있어서,

상기 검출 방법은 풀-다운 검정법(pull-down assay), 점 블롯 검정법(dot blot assay), PCR 검정법(PCR assay) 또는 샌드위치 검정법(sandwich assay)로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 58

제57항에 있어서,

상기 샌드위치 검정법은 암타머-표적-항체 검정법이며, 여기에서 상기 암타머는 기질 상에 고정화되어 있으며, 상기 항체는 고정화된 암타머에 결합된 표적을 검출하는데 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59

제57항에 있어서,

상기 샌드위치 검정법은 항체-표적-압타머 검정법이며, 여기에서 상기 항체는 기질 상에 고정화되어 있으며, 상기 압타머는 고정화된 항체에 결합된 표적을 검출하는데 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 60

제57항에 있어서,

상기 샌드위치 검정법은 압타머-표적-압타머 검정법이며, 여기에서 제1 압타머는 기질 상에 고정화되어 있으며, 제2 압타머는 제1의 고정화된 압타머에 결합된 표적을 검출하는데 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 61

제57항에 있어서,

상기 검출 방법은 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소의 정량적 측정을 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 62

SEQ ID NOS: 153-156, 158-162 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 압타머와 시료를 접촉시키는 것을 포함하는, 시료에서 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 B 사슬의 존재를 검출하는 방법.

청구항 63

제62항에 있어서,

상기 검출 방법은 풀-다운 검정법(pull-down assay), 점 블로트 검정법(dot blot assay), PCR 검정법(PCR assay) 또는 샌드위치 검정법(sandwich assay)로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 64

제63항에 있어서,

상기 샌드위치 검정법은 압타머-표적-항체 검정법이며, 여기에서 상기 압타머는 기질 상에 고정화되어 있으며, 상기 항체는 고정화된 압타머에 결합된 표적을 검출하는데 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 65

제63항에 있어서,

상기 샌드위치 검정법은 항체-표적-압타머 검정법이며, 여기에서 상기 항체는 기질 상에 고정화되어 있으며, 상기 압타머는 고정화된 항체에 결합된 표적을 검출하는데 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 66

제63항에 있어서,

상기 샌드위치 검정법은 압타머-표적-압타머 검정법이며, 여기에서 제1 압타머는 기질 상에 고정화되어 있으며, 제2 압타머는 제1의 고정화된 압타머에 결합된 표적을 검출하는데 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 67

제63항에 있어서,

상기 검출 방법은 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소의 정량적 측정을 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 68

SEQ ID NOS: 5, 11, 15, 23 및 28 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 압

타마.

청구항 69

제68항에 있어서,

상기 압타마는 클로스트리디움 디피실 독소 A에 결합하는 것을 특징으로 하는 압타마.

청구항 70

제69항에 있어서,

상기 압타마는 30nM 이하의 클로스트리디움 디피실 독소 A에 대한 K_d 를 포함하는 것을 특징으로 하는 압타마.

청구항 71

SEQ ID NOS: 32, 47, 66, 75, 83, 90, 95 및 98 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 압타마.

청구항 72

제71항에 있어서,

상기 압타마는 클로스트리디움 디피실 독소 B에 결합하는 것을 특징으로 하는 압타마.

청구항 73

제72항에 있어서,

상기 압타마는 30nM 이하의 클로스트리디움 디피실 독소 A에 대한 K_d 를 포함하는 것을 특징으로 하는 압타마.

청구항 74

SEQ ID NOS: 110, 124-125, 134, 139 및 145 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 압타마.

청구항 75

제74항에 있어서,

상기 압타마는 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 A 사슬에 결합하는 것을 특징으로 하는 압타마.

청구항 76

제75항에 있어서,

상기 압타마는 30nM 이하의 클로스트리디움 디피실 독소 A에 대한 K_d 를 포함하는 것을 특징으로 하는 압타마.

청구항 77

SEQ ID NOS: 151-152 및 157 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 압타마.

청구항 78

제77항에 있어서,

상기 압타마는 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 B 사슬에 결합하는 것을 특징으로 하는 압타마.

청구항 79

제78항에 있어서,

상기 압타마는 30nM 이하의 클로스트리디움 디피실 독소 A에 대한 K_d 를 포함하는 것을 특징으로 하는 압타마.

청구항 80

제68항, 제71항, 제74항 또는 제77항 중 어느 한 항의 압타머와 시료를 접촉시키는 것을 포함하는, 시료에서 클로스트리디움 디피실 독소의 존재를 검출하는 방법.

청구항 81

제80항에 있어서,

상기 검출 방법은 풀-다운 검정법(pull-down assay), 점 블롯 검정법(dot blot assay), PCR 검정법(PCR assay) 또는 샌드위치 검정법(sandwich assay)로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 82

제81항에 있어서,

상기 샌드위치 검정법은 압타머-표적-항체 검정법이며, 여기에서 상기 압타머는 기질 상에 고정화되어 있으며, 상기 항체는 고정화된 압타머에 결합된 표적을 검출하는데 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 83

제81항에 있어서,

상기 샌드위치 검정법은 항체-표적-압타머 검정법이며, 여기에서 상기 항체는 기질 상에 고정화되어 있으며, 상기 압타머는 고정화된 항체에 결합된 표적을 검출하는데 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 84

제81항에 있어서,

상기 샌드위치 검정법은 압타머-표적-압타머 검정법이며, 여기에서 제1 압타머는 기질 상에 고정화되어 있으며, 제2 압타머는 제1의 고정화된 압타머에 결합된 표적을 검출하는데 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 85

제81항에 있어서,

상기 검출 방법은 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소의 정량적 측정을 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서**기술 분야**

[0001]

이 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 그 전부가 본원에 통합되어 있는 2011년 3월 10일에 출원된 미국 가출원번호 제61/451.227호의 우선권을 청구한다.

[0002]

본 발명은 일반적으로 핵산(nucleic acid) 분야 및 더욱 특별하게는 클로스트리디움 디피실(*Clostridium difficile*)에 의해 생성되는 독소에 결합할 수 있고 클로스트리디움 디피실에 대한 진단 테스트에 유용한 압타머(aptamers)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 클로스트리디움 디피실 오염 또는 감염을 진단하기 위한 물질 및 방법에 관한 것이다.

[0003]

2012년 3월 9일에 만들어진 9 킬로바이트 크기의 "20120221SequenceListing005741_ST25.txt"라는 제목의 서열 목록 그 전부가 본원에 참조로서 통합되어 있다.

배경 기술

[0004]

하기 명세서는 본 발명과 관련된 정보의 요약을 제공하며, 본원에 제공된 어떠한 정보 또는 참조된 발행물들 중 어떠한 것도 본 발명에 대한 종래 기술로 인정되지 않는다.

[0005]

클로스트리디움 디피실 감염(*C. difficile* infection, CDI)은 지난 몇 년에 걸쳐 전세계적으로 확산되었다. 미국에서만 50만 이상의 사례를 가지며, CDI 관리를 위한 1년 당 32억 달러의 예측 비용을 가지는 임상적 및 경제

적 가치가 상당하다(O'Brien, J.A., et al., *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 2007. 28(11): p.1219-27).

[0006] CDI는 설사(diarrhea)를 특징으로 하는 대장(large bowel)의 염증 상태이며, 중증도가 가벼움에서부터 급성까지 일 수 있다. 보다 심각한 CDI 증후군은 위막성 대장염(pseudomembranous colitis) 및 중독성 거대결장증(toxic megacolon)이다. 가장 많은 CDI 사례들이 병원 셋팅(hospital setting) 또는 양호 시설(nursing home)에서의 나이 많은 환자들에게서 발생한다. 그러나, 입원 또한 건강한 성인들에 대한 전이증식(colonization)의 위험을 증가시킨다. 미국에서, CDI 입원 및 CDI-관련 치명률(case fatality rate)은 2000 및 2005년 사이에 두 배가 되었다. CDI 사례들에 보고되어 있는 많은 최근의 발병들은 사실상 주로 클론성(clonal)이었다. BI/NAP1/027로 분류되는 균주 타입은 사례들 중 절반 이상에 대한 원인이었고, 이 집단(epidemic) "발병(outbreak)" 균주의 특징은 높은 유병률(morbidity) 및 사망률(mortality)이며, *tcdC* 변이체 유전자의 존재하면서의 항생제(예를 들어, 플루오로퀴놀론(fluoroquinolones))에 대한 높은 내성 및 독소 과생산(toxin hyper-production)이다(Freeman, J., et al., *Clin. Microbial. Rev.*, 2010. 23(3): p.529-49; Rupnik, M., M.H. Wilcox, 및 D.N.Gerding, *Nat. Rev. Microbial.*, 2009. 7(7): p.526-36).

[0007] 항생제의 사용은 클로스트리디움 디피실을 억제하는 것 이외에는 정상 장내 균상(normal gut flora)의 파괴 때문에 CDI에 대해서는 강력한 소인 요인(predisposing factor)이다. 포자는 섭취는 클로스트리디움 디피실에 의한 인간 장내 군집화(colonization)의 주요 경로이다. 포자는 소독제에 극도로 저항성이 있으며, 생존력(viability) 또는 병원성(pathogenicity)을 거의 잃지 않고 12달 이상 동안 환경에서 버틸 수 있다. 포자는 또한 치료 후 재발하는 CDI 사례 중 20-25%에 연루되어 있다. CDI에 대한 현재의 치료법은 반코마이신(vancomycin) 또는 메트로니다졸(metronidazole)이다. CDI 재발률(recurrence rate)의 감소를 보장할 수 있는 몇몇의 새롭고, 더욱 선택적인 약제가 임상 개발단계에 있다.

[0008] 소장 내벽(intestinal lining)의 감염은 몇몇의 클로스트리디움 디피실 균주에 의해 발현되는 두 가지 독소(독소 A 및 독소 B)에 의해 야기된다. 독소 A 및 독소 B는 라스 슈퍼페밀리(Ras superfamily)에서 작은 숙주 GTPase(small host GTPase)를 표적으로 하는 글루코실트랜스퍼라아제(glucosyltransferase)이다. 그것들은 19.6 kb의 병원성 위치(pathogenicity locus)에 암호화되어 있으며, 이들 독소 유전자가 결여된 균주는 비병원성(non-pathogenic)이다. 독소생성(toxinogenic) 균주는 병원성 위치 내의 서열 가변성(sequence variability)에 따른 독소형태(toxinotype)로 더 분류될 수 있다. 독소 A 단독 또는 독소 B 단독 중 어느 하나를 제공하는 동질 유전자형 변이체(isogenic mutant)를 사용하는 것에 의하여 나타나는 것과 같은 CDI의 원인이 되는 두 독소는 시험관 내(*in vitro*)에서는 세포독성(cytotoxic)을 나타내며, 생체 내(*in vivo*)에서는 전염성(virulent)을 나타낸다(Kuehne, S.A., et al., *Nature*, 2010. 467(7316): p.711-3). 불활성화된 독소 A 및 B(독소이드(toxoids)) 및 항독소 모노클로날 항체(anti-toxin monoclonal antibodies)에 기초한 백신 프로토타입은 CDI 재발을 예방하는데 있어서의 그것들의 유효성에 대하여 연구되고 있다.

[0009] 독소 A 및 독소 B는 구조적으로 연관된, MW 300kDa 이하이며 아미노 말단 촉매 도메인(amino-terminal catalytic domain)(글루코실트랜스퍼라아제), 중심 웨피다아제 C80 도메인(central peptidase D80 domain), 전좌 도메인(translocation domain) 및 다중 카르복시-말단 베타-헤어핀 반복서열(multiple carboxy-terminal β -hairpin repeats)로 이루어진 커다란 독소이다. 클로스트리디움계 독소의 작용 메커니즘은 위장관 세포의 표면상에 존재하는 탄수화물에 대한 이들 베타-헤어핀 반복서열의 결합, 엔도펩티다아제-매개성 절단(endopeptidase-mediated cleavage) 및 촉매 도메인의 내재화(internalization)를 포함하는 것으로 나타났다(Pfeifer, G., et al., *J. Biol. Chem.*, 2003. 278(45): p.44535-41).

[0010] 몇몇의 클로스트리디움 디피실은 ADP-리보실트랜스퍼라아제 활성(ADP-ribosyltransferase activity)을 가지는 2성분 독소(binary toxin)를 생산한다. 비록 병의 발생에 있어서의 그것의 역할은 명확하지 않지만, 2성분 독소의 존재는 집단 발병 균주 BI/NAP/027에 대한 우수한 마커이다. 2성분 독소는 액틴 ADP-리보실트랜스퍼라아제 2성분 독소 A 사슬(actin ADP-ribosyltransferase binary toxin A chain) 및 포자 형성 2성분 독소 B 사슬(pore-forming binary toxin B chain)인 두 개의 서브유닛으로 이루어진다. 그것들은 독립된 폴리펩티드로서 세균 세포로부터 분비되며, 베로 세포(Vero cells)를 죽이는 것으로 나타난 강력한 세포독소를 형성하도록 결합하기 위한 잠재력을 가진다(Sundriyal, A., et al., *Protein Expr. Purif.*, 2010. 74(1): p.42-8).

[0011] 빠르고 정확한 CDI 진단은 환자 케어(patient care), 감염 관리(infection control) 및 감시(surveillance)에 중요하다. 클로스트리디움 디피실 독소 A 및 B는 그것들이 충분히 병원체-특이적 표적이며, 그것들의 존재의 입증이 CDI 진단을 위해 중요하기 때문에, 임상적 진단상의 관련성이 높다. 현재 사용되는 모든 CDI 진단 테스트는 정성적(qualitative)이며, 세가지 타입: (i) 세포독소 검정법(cytotoxin assay)(조직 배양), (ii) 비분자

적 독소 테스트(non-molecular toxin test)(EIA) 및 (iii) 분자적 테스트(PCR) 중 하나에 속한다.

[0012] 조직 배양에 기초한 세포독소 검정법은 가장 우수한 테스트 기법(gold standard)으로 간주되지만 번거로우며, 대부분의 임상 실험실에서 통상적으로 수행되지는 않는다. 본질적으로, 이 검정법은 특정 항혈청(anti-sera)으로 중성화될 수 있는 세포 배양물에서의 독소의 세포변성효과(cytotoxic effect)를 통해 클로스트리디움 디피실의 독소를 검출하는 것이다. 세포독성 검정법은 10 pg 정도의 적은 독소를 검출하며, 2010년 11월 FDA에서 배포된 "클로스트리디움 디피실의 검출을 위한 시험관 내 진단 기구의 성능 특성을 확립하는 미국 산업 및 식품의약국 스태프를 위한 초안 지침(Draft Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff Establishing the Performance Characteristics of *In Vitro* Diagnostic Devices for the Detection of *Clostridium difficile*)"에 있는 510(k) 제출서에서 추천하는 확인 테스트(confirmatory test)이다 (<http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm234868.htm>. 2010).

[0013] CDI에 대한 분자적 테스트는 몇몇의 진단 회사들을 이용할 수 있다. Cepheid GeneXpert™ 테스트는 민감도 및 특이도가 95% 이상이며, 30분 만에 결과를 제공하는 것으로 광고하고 있으며, 다중 PCR(multiplex PCR)(*tcdB*, *cdt*, *tcdC*)에 기초하고 있다. Meridian *illumigene*™ 클로스트리디움 디피실 테스트는 등온 루프 증폭법(isothermal loop amplification)에 의해 독소 생성 부위의 존재를 검출하며, 1시간 이하로 결과를 얻을 수 있다고 광고하고 있다. BD GeneOhm *Cdiff* 검정법은 2시간보다 적은 검정 프로토콜 시간 및 93.8%의 민감도와 95.5%의 특이도를 가지는, 대변 샘플로부터 직접 독소 B 유전자(*tcdB*)의 검출을 위한 실시간 PCR 방법이다. Gen-Probe 또한 PCR에 의한 독소 B 유전자(*tcdB*)를 검출하는 Prodesse ProGastro Cd 테스트를 제공하며, 91.7%의 민감도와 94.7%의 특이도를 가지며, 3시간 만에 결과를 제공하는 것으로 광고하고 있다.

[0014] CDI로 의심되는 환자로부터 얻은 대변 샘플에서 클로스트리디움 디피실 독소 검출을 위한 비분자적 테스트 또한 이용 가능하다. 효소면역검정법(enzyme immunoassay, EIAs)은 가장 널리 사용되는 클로스트리디움 디피실 공통 항원 및 독소 A/B 항원을 위한 빠른 검출 방법이지만, 전통적인 EIAs는 보통의 민감도 및 특이도를 가진다. 공지의 타입의 EIAs 중, Meridian Premier™ 독소 A/B 테스트는 가장 성능이 우수한 ELISAs로 간주되며, 1시간 이내에 대변 견본에서 두 가지 독소 모두를 검출한다. 이들 검정법은 독립적으로 테스트될 때 약 80%의 민감도와 98%의 특이도를 가진다. Premier™ 독소 A/B(Meridian) 및 클로스트리디움 디피실 TOX A/B II™(TechLab)을 위한 독소 B 항체는 병행하여 테스트될 때, 각각 125 pg 및 250 pg의 독소 B를 검출할 수 있다(Novak-Weekley, S.M. and M.H. Hollingsworth. Clin Vaccine Immunol, 2008. 15(3): p. 575-8). 많은 다른 공지의 타입의 EIA 검정법들이 시중에 나와 있지만(GA's *C. difficile* antigen, R-Biopharm's Ridascreen™ Toxin A/B; Remel's ProSpect™ Toxin A/B), 미국에서는 덜 자주 사용된다. 측면 유출 장치(lateral flow devices)를 사용하여 수행되는 막 EIA 검정법(membrane EIA assays)은 Meridian ImmunoCard™ Toxins A&B, Techlab Tox A/B Quik Chek™, 및 Remel Xpect™ 검정법이다.

[0015] 시중에 나와있는 하나의 자동화된 테스트에는 독소 테스트 및 API® 20A 스트립(strip)과 DiversiLab® 시스템을 갖춘 자동화된 세균 염기서열분석(automated bacterial genotyping)을 사용하는 배양에 기반한 확인을 겸비하는 bioMerieux's VIDAS™ *C. difficile* Toxin A&B가 있다.

[0016] EIAs와 같은 압타머-기반(aptamer-based)의 클로스트리디움 디피실 독소 테스트는 기기 또는 비싼 시약에 큰 투자를 필요로 하지 않는 분자적 테스트에 대해 이점을 가진다. 압타머는 EIAs와 같은 비분자적 검정법에 현재 사용되는 항체들에 대하여 여러 가지 뚜렷한 이점을 가진다: 압타머는 일반적으로 저분자량을 가지며, 더 높은 다중화 성능(multiplexing capabilities)(낮은 교차반응성(cross-reactivity), 일반적으로 적용가능한 검정 조건(universally-applicable assay conditions)), (열, 건조 및 용매, 가역적 재생(reverse renaturation)에 대한) 화학적 안정성을 제공하고, 시약 제조의 용이성을 제공하고, 시약 lot 간 성능에 변함이 없고, 저비용으로 생산될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 압타머는 사실상 임의의 단백질 표적, 독소 A/B 뿐만 아니라 출원인이 인식하고 있는 항체-기반 테스트가 존재

하지 않는 2성분 독소에 대하여 생성될 수 있다. 검출 및 판독 방법은 기존의 테스트들과 같을 수 있으므로, 요구되는 기기 및 훈련 요건(training requirement)들을 최소화할 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0018] 본 발명은 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 결합하는 다양한 암타머를 제공한다. 본 발명은 이러한 암타머를 포함하는 진단 키트 및 진단 방법, 및 이러한 암타머를 만들고 사용하는 방법을 포함한다.
- [0019] 제공되는 암타머는 클로스트리디움 디피실 독소 A, 독소 B, 2성분 독소 A 사슬 또는 2성분 독소 B 사슬에 결합한다. 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소를 위한 암타머를 포함하는 클로스트리디움 디피실 독소를 검출하기 위한 진단 방법이 제공되며, 이는 풀-다운 검정법(pull-down assay), 점 블롯 검정법(dot blot assay), PCR 검정법(PCR assay) 및 샌드위치 검정법(sandwich assay)을 포함하나 이로 한정되지 않는다.
- [0020] 제공되는 암타머는 선택적으로 C-5 위치가 변경된(modified) 적어도 하나의 피리미딘을 포함하며, 적어도 하나의 추가적인 화학 변형을 포함할 수 있다. 독소로부터 느린 오프-레이트(off-rate)를 가지는 클로스트리디움 디피실 독소에 결합하는 이러한 암타머를 확인하거나 생산하기 위한 암타머 및 방법 또한 제공한다. 뉴클레아제 저항성(nuclease resistance)을 가지는 클로스트리디움 디피실 독소에 결합하는 이러한 암타머를 확인하거나 생산하기 위한 암타머 및 방법 또한 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명은 클로스트리디움 디피실(*Clostridium difficile*)에 의해 생성되는 독소에 결합할 수 있고, 클로스트리디움 디피실에 대한 진단 테스트에 유용한 암타머(aptamers)를 제공하며, 또한 클로스트리디움 디피실 오염 또는 감염을 진단하기 위한 물질 및 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1a는 5개의 카르복시-말단 수용체-결합 반복서열(carboxy-terminal receptor-binding repeats)을 포함하는 클로스트리디움 디피실 독소 A(rTcdA)의 결정 구조(crystal structure)를 나타낸 것이다(Ho, J.G., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005. 102(51): p. 18373-8); Ni-NTA 아가로스 및 His-태그(His-tag)와 독소 A의 스트렙 태그(Strep tag)를 사용하는 스트렙-택틴 레진(Strep-Tactin resin)을 사용하는 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 통하여 정제된 재조합 표지 단백질(recombinant tagged protein)로서 독소 A의 정제 및 독소 A를 암호화하는 독소 유전자(*tcdA*)의 해당 부분의 PCR 증폭을 보여준다.
- 도 1b는 클로스트리디움 디피실 독소 B(rTcdB) 아미노-말단 촉매 도메인(amino-terminal catalytic domain)의 결정 구조를 나타낸 것이다(Reinert, D.J. et al. (2005), J. Mol. Biol. 351: 973-981); Ni-NTA 아가로스 및 His-태그(His-tag)와 독소 B의 스트렙 태그(Strep tag)를 사용하는 스트렙-택틴 레진(Strep-Tactin resin)을 사용하는 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 통하여 정제된 재조합 표지 단백질(recombinant tagged protein)로서 독소 B의 정제 및 독소 B를 암호화하는 독소 유전자(*tcdB*)의 해당 부분의 PCR 증폭을 보여준다.

도 1c는 전장(full-length) 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 A 사슬(binary toxin A chain)(rCdtA)의 결정 구조를 나타낸 것이다(Sundriyal, A., et al., J Biol. Chem. 2009. 284(42): p. 28713-9); Ni-NTA 아가로스 및 His-태그(His-tag)와 2성분 독소 A 사슬의 스트렙 태그(Strep tag)를 사용하는 스트렙-택틴 레진(Strep-Tactin resin)을 사용하는 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 통하여 정제된 재조합 표지 단백질(recombinant tagged protein)로서 2성분 독소 A 사슬의 정제 및 2성분 독소 A 사슬을 암호화하는 독소 유전자(*cdtA*)의 해당 부분의 PCR 증폭을 보여준다.

도 1d는 전장(full-length) 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 B 사슬(binary toxin A chain)(rCdtB)의 모형 구조(modeled structure)를 나타낸 것이다; Ni-NTA 아가로스 및 His-태그(His-tag)와 2성분 독소 B 사슬의 스트렙 태그(Strep tag)를 사용하는 스트렙-택틴 레진(Strep-Tactin resin)을 사용하는 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 통하여 정제된 재조합 표지 단백질(recombinant tagged protein)로서 2성분 독소 B 사슬의 정제 및 2성분 독소 B 사슬을 암호화하는 독소 유전자(*cdtB*)의 해당 부분의 PCR 증폭을 보여준다.

도 2a는 대조군 단백질인 독소 B 또는 BSA에 대하여 높은 특이도를 나타내는 독소 A 암타머를 사용하는 재조합 및 천연 독소 A의 풀-다운 검정법의 결과를 나타낸 것이다.

도 2b는 대조군 단백질인 재조합 및 천연 독소 A에 대하여 높은 특이도를 나타내는 독소 B 암타머를 사용하는 재조합 및 천연 독소 B의 풀-다운 검정법의 결과를 나타낸 것이다.

도 2c는 2성분 독소 B 사슬 및 대조군 단백질 BSA에 대하여 2성분 독소 A 사슬에 대하여 특이도를 나타내는 2성분 독소 A에 대한 암타머를 사용하는 풀-다운 검정법의 결과를 나타낸 것이다.

도 2d는 재조합 및 천연 독소 A의 풀-다운 검정법의 결과뿐만 아니라, 풀-다운 분획(fraction) 속에 있는 예존재하는 단백질을 보여주지 않는 랜덤 암타머를 이용한 재조합 및 천연 독소 B의 풀-다운 검정법의 결과를 나타낸 것이다.

도 3a는 독소 A에 대한 비오티닐화된(biotinylated) 암타머 및 스트렙타비딘-알카라인 포스파타아제(streptavidin-alkaline phosphatase)를 사용하는 점 블롯 상에서의 클로스트리디움 디피실의 검출을 나타낸 것이다.

도 3b는 독소 B에 대한 비오티닐화된 암타머 및 스트렙타비딘-알카라인 포스파타아제를 사용하는 점 블롯 상에서의 클로스트리디움 디피실의 검출을 나타낸 것이다.

도 4a는 독소 A와 암타머의 복합체를 포함하는 샘플로부터 용리된 암타머의 qPCR에 의한 독소 A의 정량적 검출을 나타낸 것이며, 여기에서 비결합 암타머는 독소 A에 대한 간접 측정(proxy measurement)으로서 암타머의 정량적 측정 전에 제거된다.

도 4b는 독소 B와 암타머의 복합체를 포함하는 샘플로부터 용리된 암타머의 qPCR에 의한 독소 B의 정량적 검출을 나타낸 것이며, 여기에서 비결합 암타머는 독소 B에 대한 간접 측정으로서 암타머의 정량적 측정 전에 제거된다.

도 5a는 독소 A에 대한 비오티닐화된 암타머 및 염소-항-마우스(goat-ant i-mouse) 항체로 검출되는 독소 A에 대한 마우스 모노클로날 항체를 사용하는, 스트렙타비딘 플레이트 샌드위치 검정법(streptavidin plate sandwich assay)(암타머-표적-항체)을 통한 클로스트리디움 디피실 독소 A의 검출 결과를 나타낸 것이다.

도 5b는 독소 B에 대한 비오티닐화된 암타머 및 염소-항-마우스(goat-ant i-mouse) 항체로 검출되는 독소 B에 대한 마우스 모노클로날 항체를 사용하는, 스트렙타비딘 플레이트 샌드위치 검정법(암타머-표적-항체)을 통한 클로스트리디움 디피실 독소 B의 검출 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 니트로셀룰로오스(nitrocellulose) 상에서의 샌드위치 검정법(항체-표적-암타머)을 통한 클로스트리디움 디피실 독소 A 및 B의 검출 결과를 나타낸 것이며, 여기에서 모노클로날 항체는 니트로셀룰로오스 위에 점으로 찍고 공기 중에서 건조시키고, 블록킹하고, 독소 A 또는 B를 포함하는 샘플을 첨가하고, 세척하고, 비오티닐화된 암타머를 첨가하고, 세척하고, 스트렙타비딘-알카라인 포스파타아제 결합체(conjugate)를 사용하여 발색시켰다.

도 7은 2성분 독소 A 사슬에 대한 제1 비오티닐화된 암타머를 스트렙타비딘 비드에 부착, 표적의 첨가, 2성분 독소 A 사슬에 대한 제2의 방사성 동위원소로 표지된 암타머의 첨가를 이용하는, 샌드위치 검정법(암타머-표적-암타머)에서의 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 A 사슬의 검출 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 캐치 1(Catch 1) - 캐치 2(Catch 2) 검정법의 적절한 단계를 나타낸 것이다.

도 9a 및 b는 본원에 기재된 암타머를 만드는 방법에서 사용될 수 있는 C-5 변경된 피리미딘의 예를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023]

참고문헌은 본 발명의 대표적인 구현들을 더욱 상세하게 해 줄 것이다. 본 발명은 다양한 구현들과 함께 기재될 것이지만, 본 발명은 그 구현들로 제한되는 것이 아니라는 것을 알게 될 것이다. 그와는 반대로, 본 발명은 청구항에 의해 정의된 것과 같은 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있는 모든 변형, 변경 및 동등물을 포함한다.

[0024]

당업자들은 본 발명의 실행의 범위 내에서 사용될 수 있는 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 많은 방법 및 물질들을 알 것이다. 본 발명은 결코 기재된 방법 및 물질들로 제한되지 않는다.

[0025]

달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자들에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 비록 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법,

기구 및 물질들이 본 발명의 수행 또는 시험에 사용될 수 있으나, 바람직한 방법, 기구 및 물질들이 서술된다.

[0026] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 공개된 특허 문서 및 특허 출원들은 명세서가 속하는 분야에서의 기술 수준의 지표이다. 본원에 인용된 모든 간행물, 공개된 특허 문서 및 특허 출원들은 각 개별적인 간행물, 공개된 특허 문서 또는 특허 출원이 참조로서 통합되는 것으로서 특별하고 개별적으로 표시되는 것과 같이 여기에 참조로서 통합되어 있다.

[0027] 첨부된 청구항을 포함하는 본 명세서에 사용된 것으로서, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 달리 그 내용을 명확하게 지시하지 않는 한 복수의 참조를 포함하며, "적어도 하나(at least one)" 및 "하나 또는 그 이상(one or more)"와 상호교환적으로 사용된다. 따라서, "aptamer(an aptamer)"에 대한 언급은 aptamer의 혼합물 등을 포함한다.

[0028] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "약(about)"은 수치에 관련된 사항의 기본적인 기능이 변하지 않는 정도의 수치의 대수롭지 않은 변경 또는 변형을 나타낸다.

[0029] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "aptamer 클론(aptamer clone)"은 특정 뉴클레오티드 서열의 aptamer를 말한다. aptamer 클론은 "aptamer ID No." 뿐만 아니라 "SEQ ID NO:"로 본원에서 확인된다.

[0030] 본원에서 사용된 것으로서, "경쟁 분자(competitor molecule)" 및 "경쟁자(competitor)"는 비표적 분자와 비특이적 복합체를 형성할 수 있는 임의의 분자를 칭하는데 상호교환적으로 사용된다. "경쟁 분자" 또는 "경쟁자"는 하나의 형태 또는 종류의 분자의 복제 세트이다. "경쟁 분자" 또는 "경쟁자"는 많은 이러한 분자 세트를 말한다. 경쟁 분자는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotides), 다중 음이온(polyanions)(예를 들어, 헤파린(heparin), 단일-가닥 엔터 정자 DNA(single-stranded salmon sperm DNA) 및 폴리텍스트란(polydextran)(예를 들어, 텍스트란 셀페이트(dextran sulphate)), 어베이직 포스포디에스테르 폴리머(abasic phosphodiester polymers), dNTPs 및 피로포스페이트를 포함한다. 경쟁자를 사용하는 동적 유발(kinetic challenge)의 경우에 있어서, 경쟁자는 또한 aptamer과 비특이적 복합체를 형성할 수 있는 임의의 분자일 수 있다. 이러한 경쟁 분자는 다중 양이온(polyocations)(예를 들어, 스파르민(spermine), 스파르미딘(spermidine), 폴리리신(polylysine) 및 폴리아르기닌(polyarginine) 및 아미노산(예를 들어, 아르기닌(arginine) 및 리신(lysine))을 포함한다.

[0031] 표 4, 6, 8 및 10에서 사용된 것으로서, 용어 "카운트(count)"는 SELEX로부터 얻어진 풀(pool)로부터 클론되고 서열분석된 모든 aptamer들 중 특정 aptamer 서열의 존재(occurrences)의 수를 말한다.

[0032] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "점 블롯(dot blot)"은 검정법을 말하며, 여기에서 검출될 표적 분자를 포함하는 혼합물은 점으로서 기질 상에 직접 적용되며, 이어서 친화성 분자(affinity molecule)로 표적 분자의 존재를 검출하고, 여기에서 상기 친화성 분자는 aptamer 또는 항체일 수 있으나 이로 한정되지 않는다.

[0033] 복수의 아이템과 관련하여 본원에서 사용될 때, 용어 "각(each)"은 적어도 두 개 이상의 사항을 칭한다. 복수형을 이루는 모든 사항들이 관련된 추가적인 한정을 충족할 필요는 없다.

[0034] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "포함하다("comprises", "comprising", "includes", "including", "contains", "containing")" 및 그것의 임의의 변화들은 공정, 방법, 제법 한정 제품(product-by-process) 또는 물질의 조성물(composition of matter)이 단지 그 성분만을 포함하지는 않지만 특별히 열거되지 않은 다른 성분 또는 이와 같은 공정, 방법, 제법 한정 제품 또는 물질의 조성물에 본래 포함될 수 있는 한, 비배타적인 포함(nonexclusive inclusion)을 포함한다.

[0035] 본원에 사용된 것으로서, 일련의 관련 핵산과 관련하여 사용될 때, 용어 "공통 서열(consensus sequence)"은 일련의 관련 핵산이 수리 분석 및/또는 서열 분석을 받을 경우, 서열에서 각 위치에서의 가장 일반적인 염기의 선택을 반영하는 뉴클레오티드 서열을 말한다.

[0036] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "뉴클레오티드(nucleotide)"는 리보뉴클레오티드(ribonucleotide) 또는 디옥시리보뉴클레오티드(deoxyribonucleotide) 또는 그것들의 변경된 형태뿐만 아니라 그것들의 유사체(analog)를 칭한다. 뉴클레오티드는 퓨린(purines)(예를 들어, 아데닌(adenine), 하이포크산틴(hypoxanthine), 구아닌(guanine) 및 그것들의 유도체 및 유사체)뿐만 아니라 피리미딘(pyrimidines)(예를 들어, 시토신(cytosine), 우라실(uracil), 티민(thymine) 및 그것들의 유도체 및 유사체)를 포함하는 종류들을 포함한다.

[0037] 본원에서 사용된 것으로서, "핵산(nucleic acid)", "올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)" 및 "폴리뉴클레오티드(poly-nucleotide)"는 뉴클레오티드의 중합체를 칭하기 위하여 상호교환적으로 사용되며, DNA, RNA, DNA/RNA 하이브리드 및 이러한 종류의 핵산, 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드의 변경들을 포함하고, 여기에서 임

의의 위치에서 뉴클레오티드 유닛에 대한 다양한 독립체 또는 부분들의 결합도 포함된다. 상기 용어 "폴리뉴클레오티드(poly nucleotide)", "올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)" 및 "핵산(nucleic acid)"은 이중가닥 또는 단일가닥 문자뿐만 아니라 삼중-나선(triple-helical) 문자도 포함한다. 핵산, 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드는 용어 압타머보다 더 넓은 용어이므로, 상기 용어 핵산, 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드는 압타머인 뉴클레오티드의 중합체는 포함하지만, 상기 용어 핵산, 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드는 압타머로 한정되지는 않는다.

[0038]

본원에 사용된 것으로서, 올리고뉴클레오티드에 관하여 사용될 때, 용어 "변경하다(modify)", "변경된(modified)", "변경(modification)" 및 임의의 그것들의 변형은 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드를 구성하는 4개의 염기(즉, A, G, T/U 및 C) 중 적어도 하나가 자연발생적으로 발생하는 뉴클레오티드의 유사체 또는 에스테르라는 것을 의미한다. 어떤 구현에서, 상기 변경된 뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드에 대한 뉴클레아제 저항성(nuclease resistance)을 부여한다. C-5 위치에 치환을 가지는 피리미딘은 변경된 뉴클레오티드의 예이다. 변경은 골격 변경(backbone modifications), 메틸화(methylations), 이소베이시스 이소시티딘(isobases isocytidine) 및 이소구아니딘(isoguanidine) 등과 같은 드문 염기쌍 조합(base-pairing combinations)을 포함할 수 있다. 변경은 또한 캡핑(capping)과 같은 3' 및 5' 변경을 포함할 수 있다. 다른 변경은 유사체를 사용한 하나 또는 그 이상의 자연발생적인 뉴클레오티드의 치환, 예를 들어, 비전하 결합(uncharged linkages)(예를 들어, 메틸 포스포네이트(methyl phosphonates), 포스포트리에스테르(phosphotriesters), 포스포아미데이트(phosphoamidates), 카르바메이트(carbamates) 등)을 사용한 것들 및 전하 결합(예를 들어, 포스포로디오에이트(phosphorothioates), 포스포로디티오에이트(phosphorodithioates) 등)을 사용한 것들, 인터칼레이터(intercalator)(예를 들어, 아크리딘(acridine), 소랄렌(psoralen) 등)를 사용한 것들, 칠레이터(chelators)(예를 들어, 금속(metal), 방사성 금속(radioactive metals), 봉소(boron), 산화성 금속(oxidative metals) 등)을 함유하는 것들, 알킬레이터(alkylators)를 함유하는 것들, 및 변경된 결합을 가지는 것들(예를 들어, 알파 아노머 핵산(alpha anomeric nucleic acid) 등)과 같은 뉴클레오티드 내 변경(internucleotide modification)을 포함할 수 있다. 게다가, 대개는 뉴클레오티드의 당(sugar)에 존재하는 어떤 하이드록실기는 포스포네이트기(phosphonate group) 또는 포스페이트기(phosphate group)에 의해 치환되고; 표준 보호기(standard protecting group)에 의해 보호되거나; 추가적인 뉴클레오티드 또는 고체 지지체에 추가적인 결합을 만들기 위해 활성화될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH기는 인산화(phosphorylated)되거나, 아민(amines), 약 1 내지 약 20개의 탄소 원자의 유기 캡핑기 부분(organic capping group), 일 구현에서 약 10 내지 약 80kDa 까지의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 폴리머, 다른 구현에서 약 20 내지 약 60kDa 까지의 PEG 폴리머 또는 다른 친수성 또는 소수성의 생물학적 또는 합성 폴리머로 치환될 수 있다. 일 구현에서, 변경은 피리미딘의 C-5 위치이다. 이 변경은 C-5 위치에서 직접적으로 아미드 결합을 통하여 다른 형태의 결합을 통하여 만들어질 수 있다.

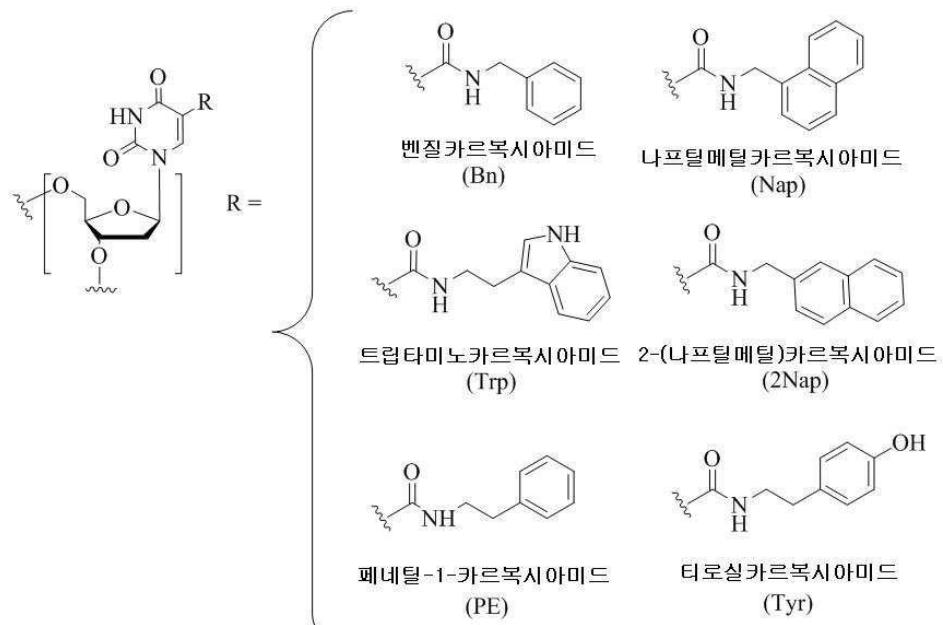
[0039]

폴리뉴클레오티드는 또한 2'-0-메틸-리보오스(2'-0-methyl-ribose), 2'-0-알릴-리보오스(2'-0-allyl-ribose), 2'-플루오로-리보오스(2'-fluoro-ribose) 또는 2'-아지도-리보오스(2'-azido-ribose), 탄소고리 당 유사체(carbocyclic sugar analogs), α -아노머 당(α -anomeric sugars), 아라비노스(arabinose), 자일로스(xyloses) 또는 릭소오스(lyxoses)와 같은 에피머 당(epimeric sugars), 피라노오스 당(pyranose sugars), 퓨라노오스 당(furanose sugars), 세도헵톨로오스(sedoheptuloses), 비고리형 유사체(acyclic analogs) 및 메틸 리보시드(methyl riboside)와 같은 어베이식 뉴클레오시드 유사체(abasic nucleoside analogs)를 포함하는, 당업계에 일반적으로 공지되어 있는 리보오스(ribose) 또는 디옥시리보오스(deoxyribose) 당(sugars)의 유사 형태(analogous forms)를 포함할 수 있다. 상기 언급한 바와 같이, 하나 또는 그 이상의 포스포디에스테르 결합(phosphodiester linkages)은 대안적인 연결기(linking group)로 치환될 수 있다. 이를 대안적인 연결기는 포스페이트가 $P(O)S$ ("티오에이트(thioate)"), $P(S)S$ ("디티오에이트(dithioate)"), $(O)NR_2$ ("아미데이트(amidate)"), $P(O)R$, $P(O)OR'$, CO 또는 CH_2 ("포름아세탈(formacetal)")로 치환되고, 각 R 또는 R'는 독립적으로 H 또는 선택적으로 에테르(-O-) 결합, 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아랄딜을 포함하는 치환 또는 비치환된 알킬(1-20 C)인 구현들을 포함한다. 폴리뉴클레오티드에서 모든 결합들이 동일할 필요는 없다. 당, 퓨린 및 피리미딘의 유사 형태의 치환은 예를 들어, 폴리아미드 골격(polyamide backbone)과 같은 대안적인 골격 구조로서 최종 생성물을 설계하는데 유리할 수 있다.

[0040]

본원에 사용된 것으로서, 상기 용어 "C-5 변경된 피리미딘(C-5 modified pyrimidine)"은 도 9에 나타낸 것들의 일부분을 포함하나 이로 한정되지 않는 C-5 위치에 변경을 가지는 피리미딘을 말한다. C-5 변경된 피리미딘의 예는 미국 특허출원 번호 제5,719,273호 및 제5,945,527호에 기재된 것들을 포함한다. C-5 변경의 예는 하기에 바로 나타내는 것과 같은 벤질카르복시아미드(benzylcarboxyamide)(대안적으로, 벤질아미노카르보닐

(benzylaminocarbonyl)(Bn)), 나프틸메틸카르복시아미드(naphthylmethylcarboxamide)(대안적으로, 나프틸메틸아미노카르보닐(naphthylmethylaminocarbonyl)(Nap)), 트립타미노카르복시아미드(triptaminocarboxamide)(대안적으로, 트립타미노카르보닐(trypaminocarbonyl)(Trp)), 티로실카르복시아미드(tyrosylcarboxamide)(대안적으로, 티로실아미노카르보닐(tyrosylaminocarbonyl)(Tyr)), 2-나프틸메틸카르복시아미드(2-naphthylmethylcarboxamide)(대안적으로, 2-나프틸메틸아미노카르보닐(2-naphthylmethylaminocarbonyl)(2Nap)) 및 폐네틸-1-카르복시아미드(phenethyl-1-carboxamide)(대안적으로, 폐네틸-1-아미노카르보닐(phenethyl-1-aminocarbonyl)(PE))로부터 독립적으로 선택되는 치환기를 사용한 C-5 위치에서의 디옥시우리딘(deoxyuridine)의 치환을 포함한다.



[0041]

C-5 변경된 피리미딘의 화학적 변경은 또한 2'-위치의 당 변경(2'-position sugar modification), 엑소시클릭아민(exocyclic amines)에서의 변경 및 4-티오우리딘(4-thiouridine)의 치환 등과 개별적으로 또는 임의의 조합으로 결합될 수 있다.

[0042]

대표적인 C-5 변경된 피리미딘은 5-(N-벤질카르복시아미드)-2'-디옥시우리딘(5-(N-benzylcarboxamide)-2'-deoxyuridine)(BndU), 5-(N-벤질카르복시아미드)-2'-0-메틸우리딘(5-(N-benzylcarboxamide)-2'-0-methyluridine), 5-(N-트립타미노카르복시아미드)-2'-플루오로우리딘(5-(N-triptaminocarboxamide)-2'-fluorouridine)(TrpdU), 5-(N-트립타미노카르복시아미드)-2'-0-메틸우리딘(5-(N-triptaminocarboxamide)-2'-0-methyluridine), 5-(N-트립타미노카르복시아미드)-2'-플루오로우리딘(5-(N-triptaminocarboxamide)-2'-fluorouridine), 5-(N-나프틸메틸카르복시아미드)-2'-디옥시우리딘(5-(N-naphthylmethylcarboxamide)-2'-deoxyuridine)(NapdU), 5-(N-나프틸메틸카르복시아미드)-2'-0-메틸우리딘(5-(N-naphthylmethylcarboxamide)-2'-0-methyluridine), 5-(N-나프틸메틸카르복시아미드)-2'-플루오로우리딘(5-(N-naphthylmethylcarboxamide)-2'-fluorouridine), 5-(N-티로실카르복시아미드)-2'-디옥시우리딘(5-(N-tyrosylcarboxamide)-2'-deoxyuridine)(TyrdU), 5-(N-티로실카르복시아미드)-2'-0-메틸우리딘(5-(N-tyrosylcarboxamide)-2'-0-methyluridine), 5-(N-티로실카르복시아미드)-2'-플루오로우리딘(5-(N-tyrosylcarboxamide)-2'-fluorouridine), 5-(N-(2-나프틸메틸)카르복시아미드)-2'-디옥시우리딘(5-(N-(2-naphthylmethyl)carboxamide)-2'-deoxyuridine)(2NapdU), 5-(N-(2-나프틸메틸)카르복시아미드)-2'-0-메틸우리딘(5-(N-(2-naphthylmethyl)carboxamide)-2'-0-methyluridine), 5-(N-(2-나프틸메틸)카르복시아미드)-2'-플루오로우리딘(5-(N-(2-naphthylmethyl)carboxamide)-2'-fluorouridine), 5-(N-폐네틸-1-카르복시아미드)-2'-디옥시우리딘(5-(N-phenethyl-1-carboxamide)-2'-deoxyuridine)(PEdU), 5-(N-폐네틸-1-카르복시아미드)-2'-0-메틸우리딘(5-(N-phenethyl-1-carboxamide)-2'-0-methyluridine) 또는 5-(N-폐네틸-1-카르복시아미드)-2'-플루오로우리딘(5-(N-phenethyl-1-carboxamide)-2'-fluorouridine)을 포함한다.

[0044]

만약 존재한다면, 뉴클레오티드 구조에 대한 변경은 폴리머의 어셈블리(assembly) 전 또는 후에 이뤄질 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 성분에 의해 끊어질 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 표지하는 성

분과의 접합에 의한 것과 같은 중합 후에 더 변경될 수 있다.

[0045] 본원에 사용된 것으로서, 핵산의 변경을 나타낼 때 상기 용어 "적어도 하나의 피리미딘(at least one pyrimidine)"은 핵산에서 임의의 또는 모든 C, T 또는 U의 임의의 또는 모든 존재가 변경되거나 그렇지 않을 수 있음을 나타내는, 핵산에 있는 하나, 여러 개 또는 모든 피리미딘을 말한다.

[0046] 본원에 사용된 것으로서, "동력학적 유발(kinetically challenge)" 및 "동적 유발(kinetic challenge)"은 운동 압(kinetic pressure)을 적용하고 해리 속도(dissociation rate)를 포함하는 이러한 분류의 복합체들의 구성요소의 서로 다른 친화 특성을 사용하는 것에 의한, 압타머 친화 복합체와 비특이적 복합체를 포함하는 복합체들의 세트로부터의 압타머 친화 복합체에 대한 증폭(enrichment) 공정을 말한다. 압타머-비표적 복합체는 전형적으로 압타머-표적 복합체에 비하여 감소되기 때문에, 동적 유발은 일반적으로 특이도를 증가시킨다. 본원에 사용된 것으로서, 용어 "운동압"은 복합체의 자연적인 분리를 위한 기회를 제공하고/하거나 복합체로부터 자연적으로 분리되는 분자의 재결합을 저해하기 위한 수단을 말한다. 운동압은 경쟁 분자의 첨가에 의해, 또는 샘플의 희석에 의해, 또는 복합체가 고체 지지체에 결합된 경우 광범위한 세척에 의해, 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 방법에 의해 적용될 수 있다. 당업자가 인식할 수 있는 것 중 하나로서, 동적 유발은 일반적으로 압타머 친화 복합체 및 압타머-비표적 복합체의 다른 해리 속도에 의존하므로, 동적 유발의 지속은 다수의 압타머-비표적 복합체를 실질적으로 감소시키는 동안 압타머 친화 복합체를 높을 비율로 유지시키도록 선택된다. 동적 유발이 효과적이게 하기 위하여, 압타머 친화 복합체의 해리 속도는 압타머-비표적 복합체의 해리 속도보다 현저하게 낮은 것이 바람직하다. 압타머는 특정 특성을 포함하도록 선택될 수 있기 때문에, 압타머 친화 복합체의 구성요소는 비교적 낮은 해리 속도(즉, 느린 오프 레이트)를 가지도록 설계될 수 있다.

[0047] 본원에 사용된 것으로서, "핵산 리간드(nucleic acid ligand)", "압타머(aptamer)" 및 "클론(clone)"은 표적 분자 상에 원하는 작용을 하는 비-자연발생적 핵산을 칭하기 위하여 상호교환적으로 사용된다. 원하는 작용은 표적의 결합, 표적을 촉매적으로 변화시키는 것, 표적 또는 표적의 기능활성을 변형하거나 변경하는 방법으로 표적과 반응시키는 것, (자살 억제제(suicide inhibitor)의 경우와 같이) 표적에 공유적으로 결합하는 것 및 표적과 다른 분자 사이에서의 반응을 용이하게 하는 것을 포함하나 이로 한정되는 것은 아니다. 다른 구현에서, 상기 작용은 왓슨/크릭 염기쌍(Watson/Crick base pairing) 또는 삼중 나선 형성(triple helix formation)과는 관계없는 메커니즘을 통하여 핵산 리간드와 결합하는 폴리뉴클레오티드 외에 삼차원 화학 구조인 표적 분자와 같은 표적 분자에 대한 특이적 결합 친화력이며, 여기에서 압타머는 표적 분자에 구애되는 공지의 생리학적 기능을 가지는 핵산이 아니다. 주어진 표적에 대한 압타머는 압타머가 표적의 리간드인 경우, (a) 표적과 후보 혼합물을 접촉시키는 것, 여기에서 상기 후보 혼합물에서 다른 핵산과는 상대적으로 표적에 대하여 증가된 친화력을 가지는 핵산은 후보 혼합물의 나머지로부터 분리될 수 있고; (b) 후보 혼합물의 나머지로부터 증가된 친화력의 핵산을 분리하는 것; 및 (c) 표적 분자의 압타머가 확인되어야 하는 리간드가 풍부한(ligand-enriched) 핵산 혼합물을 얻기 위하여 증가된 친화력의 핵산을 증폭시키는 것을 포함하는 방법에 의하여, 핵산의 후보 혼합물로부터 확인되는 핵산을 포함한다. 친화 상호작용(affinity interaction)은 정도의 문제이지만, 이 문맥에서, 그것의 표적에 대한 압타머의 "특이적 결합 친화력(specific binding affinity)"은 압타머가 일반적으로 혼합물 또는 샘플에 있는 다른 비표적 성분에 그것이 결합하는 것보다 더 높은 정도의 친화력으로 그것의 표적에 결합한다는 것을 의미하는 것으로 인식된다. "압타머(aptamer)" 또는 "핵산 리간드(nucleic acid ligand)"는 특정 뉴클레오티드 서열을 가지는 하나의 형태 또는 종류의 핵산 분자의 복제 세트이다. 압타머는 임의의 적절한 수의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. "압타머들(aptamers)"은 두 개 이상의 그러한 분자 세트를 말한다. 서로 다른 압타머들은 같거나 다른 수의 뉴클레오티드를 가질 수 있다. 압타머들은 DNA 또는 RNA 일 수 있고, 단일가닥(single stranded), 이중가닥(double stranded) 이거나 이중가닥 또는 삼중가닥(triple stranded) 영역을 포함할 수 있다.

[0048] 본원에서 사용된 것으로서, 국제순수응용화학연맹(IUPAC) 뉴클레오티드 모호성 코드(ambiguity codes)는: M = A 또는 C; R = A 또는 G; W = A 또는 N; S = C 또는 G; Y = C 또는 N; K = G 또는 N(N은 풀-특이적(pool-specific) 변경 dU를 나타낸다)이다.

[0049] 본원에 사용된 것으로서, "플라토(plateau)"는 (결합된 압타머의 분획은 y축을 따라 증가되며, 표적의 농도는 x축을 따라 똑바로 증가되는) 결합 곡선의 부분을 말하며, 거기에서 플라토는 표적에 결합된 압타머의 분획에 상대적으로 적은 변화를 야기하는 표적 농도에 도달한다. 본원에 제공된 플라토 백분율은 표적에 결합될 압타머의 100%에 관한 것이다.

[0050] 본원에 사용된 것으로서, "단백질(protein)"은 "펩티드(peptide)", "폴리펩티드(polypeptide)" 또는 "펩티드

단편(peptide fragment)"과 동일하게 사용된다. "정제된(purified)" 폴리펩티드, 단백질, 펩티드 또는 웹티드 단편은 실질적으로 세포 물질(cellular material) 또는 세포, 조직 또는 아미노산 서열이 얹어지는 세포를 포함하지 않는 공급원으로부터의 다른 오염 단백질을 포함하지 않거나, 화학적으로 합성될 때 화학 전구체 또는 다른 화학물질을 포함하지 않는다.

[0051] 본원에 사용된 것으로서, "풀-다운 검정법(pull-down assay)"은 용액으로부터의 표적의 제거를 포함하는 검정법을 말하며, 여기에서 상기 제거는 표적과 제2 분자 간의 선택적 친화성 상호작용에 의해 달성된다. 일 구현에서, 표적 분자에 대하여 선택적 친화성을 가지는 분자는 암타미이다. 다른 구현에서, 표적에 대하여 선택적 친화성을 가지는 분자는 항체이다.

[0052] 본원에 사용된 것으로서, "PCR"은 관심 표적의 존재를 검출할 수 있거나 관심 표적의 양을 정량화할 수 있는 검정법을 말한다. 상기 검정법은 관심 표적 상에 두 개의 서로 다른 비중복(non-overlapping)(비경쟁적(noncompetitive)) 영역에 결합할 수 있는 두 개의 서로 다른 친화성 분자의 사용을 요구한다. 친화성 분자는 암타미 및 항체를 포함하나, 이로 제한되지는 않는다.

[0053] 본원에 사용된 것으로서, "기질(substrate)"는 생체 분자(organic molecule)가 부착할 수 있는 플레이트(plate), 비드(bead) 또는 막(membrane)의 표면을 포함하나 이로 제한되지는 않는 표면을 말한다. 기질은 비오틴 또는 비오틴 부분(moiety)을 포함하는 분자의 부착을 가능하게 할 수 있는 스트렙타비딘을 포함하는 기질과 같은, 제2 분자의 부착을 가능하게 하는 제1 분자를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 일 구현에서, 상기 기질은 니트로셀룰로오스(nitrocellulose)이다.

[0054] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "시료(test sample)"는 하나 또는 그 이상의 관심 분석물(예를 들어, 클로스트리디움 디피실 독소 A, 독소 B, 2성분 독소 A 사슬 또는 2성분 독소 B 사슬)의 존재 또는 양이 알려져 있지 않으며, 검정법 바람직하게는 암타미를 포함하는 진단 테스트에서 측정되는 샘플을 말한다. 일 구현에서, 시료는 조직 샘플(tissue samples), 혈액(blood), 혈장(serum), 다른 체액(bodily fluids) 및 배설물(excrement)을 포함하나 이로 제한되지 않는 세포성(cellular) 및 비세포성(non-cellular) 생물학적 물질과 같은 "생물학적 샘플(biological sample)"일 수 있다. 다른 구현에서, 시료는 물, 토양 또는 공기로부터 얻을 수 있는 "환경 샘플(environmental sample)"일 수 있다. 보통, 배양 전 환경 샘플에서의 클로스트리디움 디피실의 검출은 필요하지 않다.

SELEX 방법

[0056] 용어 "SELEX" 및 "SELEX 과정(SELEX process)"은 일반적으로 (1) 바람직한 방식으로 표적 분자와 상호작용을 하거나, 예를 들어 높은 결합력으로 단백질에 결합하는 핵산의 선별과 (2) 그렇게 선별된 핵산의 증폭의 조합을 청하기 위하여 본원에서 상호교환적으로 사용된다. SELEX 과정은 특정 표적 분자 또는 바이오 마커(biomarker)에 대하여 높은 친화력을 가지는 암타미를 확인하는데 사용될 수 있다.

[0057] SELEX는 일반적으로 핵산 후보 혼합물을 제조하고, 친화 복합체(affinity complex)를 형성하기 위하여 원하는 표적 분자에 후보 혼합물을 결합하고, 결합하지 않은 후보 핵산으로부터 친화 복합체를 분리하고, 상기 친화 복합체로부터 핵산을 분리 및 단리하고, 상기 핵산을 정제하고, 특정 암타미 서열을 확인하는 것을 포함한다. 상기 과정은 선별된 암타미의 친화력을 더 개선하기 위한 다중 반복(multiple rounds)을 포함할 수 있다. 상기 과정은 상기 과정에서의 하나 또는 그 이상의 포인트에서 증폭 단계(amplification steps)를 포함할 수 있다. 예를 들어, "핵산 리간드(Nucleic Acid Ligand)"라는 제목의 미국 특허등록번호 제5,475,096호을 참고하라. 상기 SELEX 과정은 그것의 표적에 공유적으로 결합하는 암타미 뿐만 아니라 그것의 표적에 비공유적으로 결합하는 암타미를 생성하는데에도 사용될 수 있다. 예를 들어, "지수 농축에 의한 리간드의 체계적 진화: Chemi-SELEX(Systematic Evolution of Ligands of EXponential enrichment: Chemi-SELEX)"라는 제목의 미국 특허등록번호 제5,705,337호를 참고하라.

[0058] SELEX 과정은 예를 들어, 향상된 생체 내(*in vivo*) 안정성 또는 향상된 운반 특성과 같은 암타미에 향상된 특성을 부여하는 변경된 뉴클레오티드를 포함하는 고친화성(high-affinity) 암타미를 확인하는데 사용될 수 있다. 그러한 변경의 예는 리보오스 및/또는 포스페이트 및/또는 염기 위치에서의 화학적 치환을 포함한다. SELEX 과정에서 확인된 변경된 뉴클레오티드를 포함하는 암타미는 피리미딘의 5'- 및 2'-위치에 화학적으로 변경된 뉴클레오티드 유도체를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 개시하고 있는 "변경된 뉴클레오티드를 포함하는 고친화성 핵산 리간드(High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides)"라는 제목의 미국 특허등

록번호 제5,660,985호에 기재되어 있다. 앞의 미국 특허등록번호 제5,580,737호는 2'-아미노(2'-NH₂), 2'-플루오로(2'-F) 및/또는 2'-0-메틸(2'-OMe)로 변경된 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 매우 특이적인 암타머를 기재하고 있다. 또한, 확장된 물리적 및 화학적 특성을 가지는 핵산 라이브러리 및 SELEX와 photoSELEX에서의 그것들의 용도를 기재하고 있는 "SELEX 및 PHOTOSELEX"라는 제목의 미국 특허공개번호 제2009/0098549호를 참고하라.

[0059] 상기 뉴클레아제 저항성 올리고뉴클레오티드는 도 9에 제시된 것들로부터 선택된 기를 사용한 C-5 위치 변경된 적어도 하나의 피리미딘을 포함한다. 다양한 구현에서, 변경은 상기에 나타낸 바와 같은 벤질카르복시아미드(benzyl carboxyamide)(Bn), 나프틸메틸카르복시아미드(naphthylmethyl carboxyamide)(Nap), 트립타미노카르복시아미드(triptaminocarboxyamide)(Trp), 티로실카르복시아미드(tyrosyl carboxyamide)(Tyr), (2-나프틸메틸)카르복시아미드((2-naphthylmethyl)carboxyamide)(2Nap) 및 페네틸-1-카르복시아미드(phenethyl-1-carboxyamide)(PE)로부터 독립적으로 선택되는 치환기를 사용한 C-5 위치에 디옥시우리딘의 치환을 포함한다.

[0060] SELEX는 또한 바람직한 오프-레이트(off-rate) 특성을 가지는 암타머를 확인하는데 사용될 수 있다. 표적 분자에 결합할 수 있는 암타머를 생성하기 위한 향상된 SELEX 방법을 기재하고 있는 "향상된 오프-속도를 가지는 암타머를 생성하기 위한 방법(Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates)"이라는 제목의 미국 특허공개번호 제2009/0004667호를 참조하라. 그것들의 대표적인 표적 분자로부터 더 느린 해리 속도를 가지는 암타머 및 포토 암타머를 생산하기 위한 방법을 개시하고 있다. 상기 방법은 핵산-표적 복합체의 형성이 일어나도록 표적 분자와 후보 혼합물을 접촉시키고, 낮은 오프-레이트 농축 과정(enrichment process)을 수행하는 것을 포함하며, 빠른 해리 속도를 가지는 핵산-표적 복합체는 분리되어 재형성되지 않는 반면 느린 해리 속도를 가지는 복합체는 그대로 유지된다. 게다가, 상기 방법은 향상된 오프-레이트 성능을 가지는 암타머를 생성하기 위하여 후보 핵산 혼합물의 생산에서 변경된 뉴클레오티드의 사용을 포함한다("SELEX 및 PhotoSELEX"라는 제목의 미국 특허공개번호 제2009/0098549호를 참조).

[0061] "표적(target)" 또는 "표적 분자(target molecule)"은 본원에서 핵산이 원하는 방식으로 작용할 수 있는 임의의 화합물을 말한다. 표적 분자는 제한 없이 단백질(protein), 펩티드(peptide), 핵산(nucleic acid), 탄수화물(carbohydrate), 지질(lipid), 다당류(polysaccharide), 글리코단백질(glycoprotein), 호르몬(hormone), 수용체(receptor), 항원(antigen), 항체(antibody), 바이러스(virus), 병원체(pathogen), 독성 물질(toxic substance), 기질(substrate), 대사물질(metabolite), 전이상태 유사체(transition state analog), 보조인자(cofactor), 억제제(inhibitor), 약물(drug), 염료(dye), 영양분(nutrient), 성장인자(growth factor), 세포(cell), 조직(tissue), 임의의 앞서 언급한 것들의 임의의 부분 또는 단편 등일 수 있다. 사실상, 임의의 화학적 또는 생물학적 반응기(effector)는 적절한 표적일 수 있다. 임의의 크기의 분자들이 표적으로서 제공될 수 있다. 표적은 또한 표적과 핵산 간의 상호작용의 가능성 또는 세기를 강화시키기 위하여 어떤 방식으로 변경될 수 있다. 표적은 또한 단백질의 경우에 있어서 예를 들어, 아미노산 서열에서의 작은 변화, 이황화 결합 형성(disulfide bond formation), 글리코실화(glycosylation), 지질화(lipidation), 아세틸화(acetylation), 인산화(phosphorylation)와 같은 특정 화합물 또는 분자의 임의의 작은 변화 또는 실질적으로 분자의 동일성은 변경하지 않는 표지 성분과의 접합과 같은 임의의 다른 조작 또는 변경을 포함할 수 있다. "표적 분자" 또는 "표적"은 암타머에 결합할 수 있는 하나의 형태 또는 종류의 분자 또는 다분자 구조의 복제 세트이다. "표적 분자들(target molecules)" 또는 "표적들(targets)"은 두 개 이상의 그러한 분자 세트를 말한다. 표적이 펩티드인 SELEX 과정의 구현은 "정제된 단백질을 포함하지 않는 변경된 SELEX 과정"이라는 제목의 미국 특허등록번호 제6,376,190호에 개시되어 있다. 상기 예시적 경우에 있어서, 표적은 클로스트리디움 디피실 독소 A, 독소 B, 2성분 독소, 2성분 독서 A 사슬 또는 2성분 독서 B 사슬을 포함한다.

[0062] 클로스트리디움 디피실 독소에 대한 암타머를 확인 또는 생산하는 방법

[0063] 본 발명은 (a) 핵산의 후보 혼합물을 제조하고, 여기에서 상기 후보 혼합물은 후보 혼합물의 적어도 하나 또는 각각의 핵산에 하나, 여러 개의 또는 모든 피리미딘이 C-5 위치에 화학적 변경을 포함하는 변경된 핵산을 포함하며; (b) 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 상기 독소인 표적과 후보 혼합물을 접촉시키고, 느린 오프-레이트 농축 과정에 상기 후보 혼합물을 노출시키고, 여기에서 후보 혼합물에서 다른 핵산과 관련된 표적으로부터 느린 해리 속도를 가지는 핵산은 표적과 결합하며, 핵산-표적 분자 복합체를 형성하고; (c) 상기 후보 혼합물로부터 느린 오프-레이트 핵산을 분리하고; (d) 느린 오프-레이트를 가지는 표적 분자에 결합할 수 있는 핵산 서열이 풍부한 핵산의 혼합물을 얻기 위하여 느린 오프-레이트 핵산을 증폭하고, 이를 통하여 표적 분자에 대한

느린 오프-레이트 암타머를 확인할 수 있는 것을 포함하는 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 결합하는 느린 오프-레이트 암타머를 확인 또는 생산하는 방법을 제공하며, 여기에서 상기 독소는 독소 A, 독소 B, 2성분 독소 A 사슬 및 2성분 독소 B 사슬로부터 선택된다. 클로스트리디움 디피실 독소에 대한 느린 오프-레이트 암타머를 확인하거나 생산하는 방법은 C-5 위치에서의 화학적 변경이 도 9에 나타낸 변경들 중 적어도 하나로부터 독립적으로 선택되는 적어도 하나의 피리미딘을 포함할 수 있다. 클로스트리디움 디피실 독소에 대한 느린 오프-레이트 암타머를 확인하거나 생산하는 방법은 적어도 하나의 피리미딘을 포함할 수 있고, 여기에서 C-5 위치에서의 화학적 변경은 벤질카르복시아미드(benzylcarboxamide), 나프틸메틸카르복시아미드(naphthylmethylcarboxamide), 트립타미노카르복시아미드(tryptaminocarboxamide), 티로실카르복시아미드(tyrosylcarboxamide), 2-나프틸메틸카르복시아미드(2-naphthylmethylcarboxamide) 및 폐네틸-1-카르복시아미드(phenetethyl-1-carboxamide)로부터 독립적으로 선택된다. 클로스트리디움 디피실 독소에 대한 느린 오프-레이트 암타머를 확인하거나 생산하는 방법은 적어도 하나의 피리미딘을 포함할 수 있고, 여기에서 상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 리보오스 위치(ribose position), 디옥시리보오스 위치(deoxyribose position), 포스페이트 위치(phosphate position) 및 염기 위치(base position)로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 위치에서의 화학적 치환이다. 게다가, 클로스트리디움 디피실 독소에 대한 느린 오프-레이트 암타머를 확인하거나 생산하는 방법은 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경을 포함할 수 있고, 여기에서 상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 독립적으로 2'-위치 당 변경(2'-position sugar modification), 2'-아미노(2'-NH₂)(2'-amino(2'-NH₂)), 2'-플루오로(2'-F)(2'-fluoro(2'-F)), 2'-0-메틸(2'-OMe)(2'-0-methyl(2'-OMe)), 시토신 엑소시클릭 아민(cytosine exocyclic amine)에서의 변경, 5-브로모우라실(5-bromouracil)의 치환, 5-브로모디옥시우리딘(5-bromodeoxyuridine)의 치환, 5-브로모디옥시시티딘(5-bromodeoxycytidine)의 치환, 골격 변경(backbone modification), 메틸화(methylation), 3' 캡(3' cap) 및 5' 캡(5' cap)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 클로스트리디움 디피실 독소에 대한 느린 오프-레이트 암타머를 확인하거나 생산하는 방법은 경쟁 분자와 후보 혼합물을 배양, 후보 혼합물의 희석 또는 경쟁 분자의 존재하에 후보 혼합물의 희석으로부터 선택되는 느린 오프-레이트 농축(enrichment) 과정을 포함할 수 있다.

[0064]

본 발명은 또한 (a) 핵산 후보 혼합물을 제조하는 단계, 여기에서 상기 후보 혼합물은 후보 혼합물 중 적어도 하나 또는 각각의 핵산에 하나, 여러 개 또는 모든 피리미딘이 C-5 위치에 화학적 변경을 포함하는 변경된 핵산을 포함하며; (b) 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소인 표적과 후보 혼합물을 접촉시키고, 상기 후보 혼합물을 느린 오프-레이트 농축 과정에 노출시키고, 여기에서 상기 후보 혼합물에서 다른 핵산과 관련된 표적 분자로부터 느린 해리 속도를 가지는 핵산은 표적에 결합하며, 핵산-표적 분자 복합체를 형성하는 단계; (c) 후보 혼합물로부터 느린 오프-레이트 핵산을 분리하는 단계; 및 (d) 느린 오프-레이트를 가지는 표적 분자와 결합할 수 있는 핵산 서열이 풍부한 핵산 혼합물을 얻기 위하여 느린 오프-레이트 핵산을 증폭시켜 표적 분자에 대한 느린 오프-레이트 암타머를 확인하는 단계를 포함하는 과정에 의해 확인되는 핵산 서열에 기초한 암타머를 제조하거나 합성하는 단계를 포함하는, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소로부터 느린 분해 속도를 가지는 암타머를 생산하는 방법을 제공하며, 여기에서 상기 독소는 독소 A, 독소 B, 2성분 독소 A 사슬 및 2성분 독소 B 사슬로부터 선택된다. 이러한 클로스트리디움 디피실 독소로부터 느린 해리 속도를 가지는 암타머를 생산하는 방법은 C-5 위치에서의 화학적 변경이 도 9에 나타낸 변경들 중 적어도 하나로부터 독립적으로 선택되는 적어도 하나의 피리미딘을 포함할 수 있다. 클로스트리디움 디피실 독소로부터 느린 해리 속도를 가지는 암타머를 생산하는 방법은 적어도 하나의 피리미딘을 포함할 수 있고, 여기에서 상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 벤질카르복시아미드(benzylcarboxamide), 나프틸메틸카르복시아미드(naphthylmethylcarboxamide), 트립타미노카르복시아미드(tryptaminocarboxamide), 티로실카르복시아미드(tyrosylcarboxamide), 2-나프틸메틸카르복시아미드(2-naphthylmethylcarboxamide) 및 폐네틸-1-카르복시아미드(phenetethyl-1-carboxamide)로부터 독립적으로 선택된다. 클로스트리디움 디피실 독소로부터 느린 해리 속도를 가지는 암타머를 생산하는 방법은 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경을 포함할 수 있고, 여기에서 상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 리보오스 위치(ribose position), 디옥시리보오스 위치(deoxyribose position), 포스페이트 위치(phosphate position) 및 염기 위치(base position)로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 위치에서의 화학적 치환이다. 또한, 클로스트리디움 디피실 독소로부터 느린 해리 속도를 가지는 암타머를 생산하는 방법은 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경을 포함할 수 있고, 여기에서 상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 독립적으로 2'-위치 당 변경(2'-position sugar modification), 2'-아미노(2'-NH₂)(2'-amino(2'-NH₂)), 2'-플루오로(2'-F)(2'-fluoro(2'-F)), 2'-0-메틸(2'-OMe)(2'-0-methyl(2'-OMe)), 시토신 엑소시클릭 아민(cytosine exocyclic amine)에서의 변경, 5-브로모우라실(5-bromouracil)의 치환, 5-브로모디옥시우리딘(5-bromodeoxyuridine)의 치환, 5-브로모디옥시시티딘(5-bromodeoxycytidine)의 치환, 골격 변경(backbone

modification), 메틸화(methylation), 3' 캡(3' cap) 및 5' 캡(5' cap)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 클로스트리디움 디시필 독소로부터 느린 해리 속도를 가지는 암타머를 생산하는 방법은 경쟁 분자와 후보 혼합물의 배양, 후보 혼합물의 희석 또는 경쟁 분자의 존재하에서의 후보 혼합물의 희석으로부터 선택되는 느린 오프-레이트 농축 과정을 포함할 수 있다.

[0065]

본 발명은 또한 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 결합하는 뉴클레아제 저항성(nuclease resistant) 암타머를 생산하는 방법을 제공하며, 여기에서 상기 독소는 독소 A, 독소 B, 2성분 독소 A 사슬 및 2성분 독소 B 사슬로부터 선택되고, 상기 방법은 (a) 변경된 핵산의 후보 혼합물을 제조하는 것, 여기에서 후보 혼합물은 후보 혼합물의 적어도 하나 또는 각각의 핵산에서 적어도 하나의 피리미딘이 C-5 위치에 화학적 변경을 포함하는 변경된 핵산을 포함하고; (b) 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 상기 독소인 표적과 후보 혼합물을 접촉시키고, 여기에서 후보 혼합물에서 다른 핵산에 관련된 표적 분자에 증가된 친화력을 가지는 핵산은 표적 분자에 결합하며, 핵산-표적 분자 혼합체를 형성하는 것; (c) 후보 혼합물의 잔여물로부터 증가된 친화력의 핵산을 분리하는 것; 및 (d) 증가된 친화력으로 표적 분자에 결합할 수 있고 뉴클레아제 저항성인 핵산 서열이 풍부한 핵산 혼합물을 얻기 위하여 증가된 친화력의 핵산을 증폭시켜 표적 분자에 대한 뉴클레아제 저항성 암타머를 확인하는 것을 포함하는 과정에 의해 확인되는 핵산 서열에 기초하여 상기 뉴클레아제 저항성 암타머를 제조하거나 합성하는 것을 포함한다. 클로스트리디움 디피실 독소에 대한 뉴클레아제 저항성 암타머를 생산하는 방법은 적어도 하나의 피리미딘을 포함하며, C-5 위치에서의 화학적 변경이 도 9에 나타낸 변경들 중 적어도 하나로부터 독립적으로 선택되는 적어도 하나의 피리미딘을 포함할 수 있다.

[0066]

클로스트리디움 디피실 독소에 대한 뉴클레아제 저항성 암타머를 생산하는 방법은 C-5 위치에서의 화학적 변경이 벤질카르복시아미드, 나프틸메틸카르복시아미드, 트립타미노카르복시아미드, 티로실카르복시아미드, 2-나프틸메틸카르복시아미드 및 폐네틸-1-카르복시아미드로부터 독립적으로 선택되는 적어도 하나의 피리미딘을 포함할 수 있다. 클로스트리디움 디피실 독소에 대한 뉴클레아제 저항성 암타머를 생산하는 방법은 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경을 포함할 수 있으며, 여기에서 상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 리보오스 위치(ribose position), 디옥시리보오스 위치(deoxyribose position), 포스페이트 위치(phosphate position) 및 염기 위치(base position)로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 위치에서의 화학적 치환이다. 또한, 클로스트리디움 디피실 독소에 대한 뉴클레아제 저항성 암타머를 생산하는 방법은 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경을 포함할 수 있으며, 여기에서 상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 독립적으로 2'-위치 당 변경(2'-position sugar modification), 2'-아미노(2'-NH₂)(2'-amino(2'-NH₂)), 2'-플루오로(2'-F)(2'-fluoro(2'-F)), 2'-0-메틸(2'-OMe)(2'-0-methyl(2'-OMe)), 시토신 엑소시클릭 아민(cytosine exocyclic amine)에서의 변경, 5-브로모우라실(5-bromouracil)의 치환, 5-브로모디옥시우리딘(5-bromodeoxyuridine)의 치환, 5-브로모디옥시시티딘(5-bromodeoxycytidine)의 치환, 골격 변경(backbone modification), 메틸화(methylation), 3' 캡(3' cap) 및 5' 캡(5' cap)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0067]

암타머

[0068]

본 발명의 클로스트리디움 디피실에 대한 암타머는 상기에 기재한 바와 같이 느린 오프-레이트를 가지는 암타머를 확인하기 위한 개선된 SELEX 방법을 사용하여 확인되었다. 선별 과정에서 사용된 클로스트리디움 디피실 독소의 형태는 실시예 1에 기재된 바와 같은 클로스트리디움 디피실 계놈 DNA로부터의 원하는 유전자 단편(gene fragment)의 PCR 증폭에 의해 제조된 재조합 독소이다.

[0069]

SELEX는 클론된 클로스트리디움 디피실 독소 유전자 단편의 과발현으로부터 얻어진 정제된 His-tag 단백질을 사용하여 수행하였다. dU 대신에 6개의 변경된 뉴클레오티드 5-티로실카르복시아미드-dU(TyrdU), 5-벤질카르복시아미드-dU(BndU), 5-나프틸메틸카르복시아미드-dU(NapdU), 5-트립타미노카르복시아미드-dU(TrpdU), 5-(2-나프틸메틸)카르복시아미드-dU(2NapdU) 또는 5-페네틸-1-카르복시아미드(PEdU) 중 하나를 포함하는 40mer의 랜덤 서열 라이브러리를 사용하였다. 선별을 7 라운드 또는 8 라운드 수행하고, 라운드 2-8에서 데스트란 설페이트(dextran sulfate)를 사용한 동적 유발을 적용하였다. SELEX의 마지막 라운드 후에 얻어진 암타머 폴(pool)을 필터 결합 검정(filter binding assay)에서 그것들의 표적에 대한 친화력에 대하여 테스트하고, K_d 및 플라토를 측정하였다(표 2). 충분한 친화력(~10nM 또는 그 이하의 K_d)을 가지는 모든 폴을 클론하고, 폴당 적어도 48개 클론의 서열을 검출하였다.

[0070] 독소 A에 대한 압타머

독소 A에 대한 압타머 풀 4943(TrpdU)은 $K_d = 2.42\text{nM}$ 으로 탁월한 친화력을 가졌다. 풀 4936(TyrdU) 및 4939(NapdU)은 각각 11.5 및 10.8nM 의 K_d 로 활성이 있었다. 풀 5564(2NapdU) 및 5577(2NapdU)은 4.63 및 6.40nM 의 K_d 로 우수한 친화력을 가졌다. 독소 A에 대한 압타머 풀 5570(PEdU)은 $K_d = 1.61\text{nM}$ 로 가장 우수하였다. TrpdU, TyrdU, NapdU, 2NapdU 및 PEdU 변경 뉴클레오티드를 가지는 모든 풀로부터 독소 A에 대하여 우수한 친화력을 가지는 압타머 풀을 분리하였고(표 3); 클로스트리디움 디피실 독소 A 압타머의 서열을 표 4에 열거하였다. 독소 A에 대하여 우수한 결합 친화력을 가지는 압타머 클론을 확인하는 것 이외에, 이러한 압타머 클론들 간의 공통서열도 확인하였다.

풀 5570(PEdU)로부터의 가장 주요한 압타머 클론(leading aptamer clone)은 5570-54이며, 재조합 독소 A에 대해서는 $K_d = 0.12\text{nM}$ 이었고, 천연 독소 A에 대해서는 $K_d = 6.91\text{nM}$ 이었다.

몇몇의 압타머 클론들은 재조합 독소 A 및 천연 독소 A 모두에 대하여 탁월한 친화력을 나타내었으며, 예를 들어 압타머 클론 4943-51(TrpdU)는 재조합 독소 A에 대해서는 $K_d = 1.23\text{nM}$, 천연 독소 A에 대해서는 $K_d = 1.78\text{nM}$ 이었고; 압타머 클론 5564-49(2NapdU)는 재조합 독소 A에 대해서는 $K_d = 1.13$, 천연 독소 A에 대해서는 $K_d = 1.78$ 이었다.

몇몇의 압타머 클론들은 재조합 독소 A 및 천연 독소 A 간에 상대적으로 적은 친화력의 감소를 나타났으며, 예를 들어 압타머 클론 5577-1(2NapdU)는 재조합 A에 대해서는 $K_d = 1.59\text{nM}$, 천연 독소에 대해서는 $K_d = 4.97\text{nM}$ 이었고; 압타머 클론 5577-3(2NapdU)은 재조합 독소 A에 대해서는 $K_d = 1.73\text{nM}$, 천연 독소에 대해서는 $K_d = 5.52\text{nM}$ 이었고; 압타머 클론 4943-60(TrpdU)는 재조합 독소 A에 대해서는 $K_d = 2.65\text{nM}$, 천연 독소 A에 대해서는 $K_d = 4.57$ 이었다.

독소 A에 대하여 우수한 결합 친화력을 가지는 압타머 클론을 확인하는 것 외에, 이러한 압타머 클론 간의 공통서열도 확인하였다.

[0076] 독소 B에 대한 압타머

독소 B에 대한 압타머의 친화력은 일반적으로 매우 우수하며, SELEX에서 사용된 클로스트리디움 디피실 독소 B 단편의 68.8 kDa 아미노-말단 촉매 도메인(amino-terminal catalytic domain)과 270 kDa 천연 전장 독소 B 간에 상관관계가 잘 나타나 있다. TyrdU, BndU, NapdU, TrpdU, 2NapdU 및 PEdU 변경 뉴클레오티드를 가지는 모든 풀로부터 독소 B에 대하여 서브 나노몰(subnanomolar) 단위의 K_d 를 가지는 압타머 클론을 분리하였고(표 5); 클로스트리디움 디피실 독소 B 압타머의 서열을 표 6에 열거하였으며, 가장 우수한 클론을 볼드체로 나타내었다.

가장 높은 친화력을 가지는 압타머는 NapdU 또는 TrpdU 변경 뉴클레오티드를 가지는 클론이었다. 다섯 개의 압타머가 0.1nM 미만의 매우 낮은 K_d 를 나타내었으며; 압타머 클론 4940-1(NapdU)은 재조합 독소 B에 대해서는 $K_d = 0.04\text{nM}$, 천연 독소 A에 대해서는 $K_d = 0.06\text{nM}$ 이었고; 압타머 클론 4940-23(NapdU)은 재조합 독소 B에 대해서는 $K_d = 0.07\text{nM}$, 천연 독소 A에 대해서는 $K_d = 0.09\text{nM}$ 이었고; 압타머 클론 4940-27(NapdU)은 재조합 독소 B에 대해서는 $K_d = 0.10\text{nM}$, 천연 독소 A에 대해서는 $K_d = 0.09\text{nM}$ 이었고; 압타머 클론 4944-5(TrpdU)는 재조합 독소 B에 대해서는 $K_d = 0.08\text{nM}$, 천연 독소 A에 대해서는 $K_d = 0.09\text{nM}$ 이었고; 압타머 클론 4944-30(TrpdU)은 재조합 독소 B에 대해서는 $K_d = 0.06\text{nM}$, 천연 독소 A에 대해서는 $K_d = 0.08\text{nM}$ 이었다. TrpdU, TyrdU, NapdU, 2NapdU, BndU 및 PEdU 변경 뉴클레오티드를 가지는 모든 풀로부터 독소 B에 대하여 우수한 친화력을 가지는 압타머 클론을 분리하였고(표 5); 클로스트리디움 디피실 독소 B 압타머의 서열을 표 6에 열거하였다. 독소 B에 대하여 우수한 결합 친화력을 가지는 압타머 클론을 확인하는 것 외에, 이러한 압타머 클론들 간의 공통 서열도 확인하였다.

[0079] 2성분 독소(A 사슬)에 대한 압타머

재조합 2성분 독소 B 사슬(CdtA)를 이용하는 SELEX로 TrpdU, 2NapdU 및 PEdU 변경 뉴클레오티드(표 7)를 가지는 활성 압타머를 생산하였다. CdtA의 서열 및 공통 서열 패턴을 표 8에 나타내었다. 풀 4758(TrpdU)의 클로닝은 클론 4758-6이 그 풀에 있는 서열의 18%를 차지하며, CdtA 2성분 독소에 대하여 우수한 친화력($K_d = 0.86\text{nM}$)을 나타낸다는 것을 보여주었다. 2NapdU 풀로부터 20개의 서열을 얻었고, 그것들 중 대부분은 서브 나노몰 단위의 친화력을 가지며, 이들 2NapdU 클론 사이에 공유되는 몇몇의 서열 패턴들을 확인하였다. PEdU 풀은 다섯 개의 활성 압타머를 포함하고 있었다.

[0081] 2성분 독소(B 사슬)에 대한 압타머

재조합 2성분 독소 B 사슬(CdtB)를 이용하는 SELEX로 2NapdU 변경 뉴클레오티드(표 9)를 가지는 활성 압타머를 생산하였다. CdtB 압타머의 서열 및 공통 서열 패턴을 표 10에 나타내었다. 가장 활성이 높은 클론은 $K_d = 1.68\text{nM}$ 인 5556-51이었다.

본 발명은 SELEX 방법을 사용하여 확인된 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 압타머를 제공하며, 이를 표 4, 6, 8 및 10에 열거하였다. 상기 열거된 압타머 중 어느 하나와 실질적으로 상동 (substantially homologous)하며, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 각각의 독소와 결합하는데 표 4, 6, 8 및 10에 제시된 압타머의 군으로부터 선택된 압타머와 실질적으로 유사한 능력을 가지는, 클로스트리디움 디피 실에 의해 생성된 독소에 대한 압타머들 또한 본 발명에 포함된다. 또한, 본원에서 확인된 압타머와 실질적으로 동일한 구조적 형태를 가지며, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 각각의 독소와 결합하는데 표 4, 6, 8 및 10에 제시된 압타머 세트의 군으로부터 선택된 압타머와 실질적으로 유사한 능력을 가지는, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 각각의 독소에 대한 압타머들 또한 본 발명에 포함된다.

[0084] 일 양상에서, 본 발명은 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 특이적으로 결합하며, 1차(primary) 핵산 서열을 포함하는 압타머를 제공한다. 일 구현에서, 1차 핵산 서열은 표 4, 6, 8 또는 10에 기재되어 있는 서열로부터 선택된다. 다른 구현에서, 1차 핵산 서열은 표 4, 6, 8 또는 10에 기재되어 있는 1차 핵산 서열과 적어도 약 75% 동일하고, 적어도 약 80% 동일하고, 적어도 약 85% 동일하고, 적어도 약 90% 동일하고, 또는 적어도 약 95% 동일하도록 선택된다.

[0085] 용어 "서열 동일성(sequence identity)", "퍼센트 서열 동일성(percent sequence identity)", "퍼센트 동일성(percent identity)", "% 동일한(identical)", "% 동일성(% idenety)" 및 그것들의 변형은, 두 개 또는 그 이상의 핵산 서열이라는 맥락에서 사용될 때, 서열 비교 알고리즘(sequence comparison algorithm)을 사용하거나 육안 검사(visual inspection)에 의해 측정된 것으로서 최대 관련성에 대하여 비교되고 정렬될 때, 동일하거나 동일한 뉴클레오티드의 특정 백분율을 가지는 두 개 또는 그 이상의 서열 또는 부분서열(subsequence)을 칭하는데 상호교환적으로 사용된다. 서열 비교를 위하여, 전형적으로 하나의 서열은 비교되는 테스트 서열에 대한 참조 서열(reference sequence)로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 때, 테스트 및 참조 서열을 컴퓨터에 입력하고, 만약 필요하다면 부분서열 좌표를 설계하고, 서열 알고리즘 프로그램 매개변수를 지정하였다. 그 후, 서열 비교 알고리즘은 지정된 프로그램 매개변수에 기초하여 참조 서열에 대한 테스트 서열의 퍼센트 서열 동일성을 계산한다. 비교를 위한 서열들의 최적의 정렬은 예를 들어, 스미스 및 워터만 등의 국부 상동성(local homology) 알고리즘(Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981), 니들만 및 분쉬 등의 상동성 정렬 알고리즘(Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970), 피어슨 및 리프만 등의 유사성 검색 방법(Pearson and Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444), 이러한 알고리즘의 컴퓨터화된 실행(GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) 또는 육안 검사(일반적으로, Ausubel, F. M. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, pub. by Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987)을 참조)에 의해 수행될 수 있다.

[0086] 퍼센트 서열 상동성을 측정하기에 적합한 알고리즘 중 하나의 예는 기본적인 부분 정렬 탐색 도구(basic local alignment search tool)(이하 "BLAST"라 함)에서 사용되는 알고리즘이다(예를 들어, Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990 and Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 15:3389-3402, 1997를 참조). BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information)(이하 "NCBI")를 통하여 공중에게 이용가능하다. NCBI로부터 입수가능한 소프트웨어, 예를 들어 (뉴클레오티드 서열

을 위한) BLASTN을 사용하여 서열 동일성을 결정하는데 사용되는 디폴트 매개변수(default parameter)는 맥기니스 등에 기재되어 있다(McGinnis *et al.*, Nucleic Acids Res., 32:W20-W25, 2004).

[0087]

본원에 사용된 것으로서, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 암타머와 같은 핵산의 퍼센트 동일성을 기재할 때, 예를 들어, 참조 뉴클레오티드 서열에 대하여 적어도 약 95% 동일한 서열은 핵산 서열이 참조 핵산 서열의 각 100개의 뉴클레오티드 당 5개 이하의 점 돌연변이(point mutations)를 포함할 수 있다는 것을 제외하면, 그 핵산 서열이 참조 서열과 동일하다는 것을 의미한다. 즉, 원하는 핵산 서열, 참조 핵산 서열에 대하여 적어도 약 95% 동일한 서열을 얻기 위하여, 참조 서열에서 5% 이하의 뉴클레오티드는 결실되거나 다른 뉴클레오티드로 치환될 수 있고, 또는 참조 서열에서 총 뉴클레오티드 수 중 5% 이하의 몇몇의 수의 뉴클레오티드는 참조 서열 내로 삽입될 수 있다(본원에서는 삽입(insertion)으로 칭함). 원하는 서열을 만들기 위한 참조 서열의 이러한 변이는 참조 뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치에서 일어날 수 있거나, 참조 서열 또는 참조 서열 내의 하나 또는 그 이상의 연속적인 그룹에서의 뉴클레오티드들 중에서 개별적으로 배치된 그 말단 위치들 사이의 어디에서도 일어날 수 있다. 참조(쿼리) 서열은 표 4, 6, 8 또는 10에 나타낸 전체 뉴클레오티드 서열들 중 어느 하나 또는 이 서열들 중 어느 하나의 임의의 단편일 수 있다.

[0088]

일 양상에서, SEQ ID NOS: 5, 11, 15, 23, 28, 32, 47, 66, 75, 83, 90, 95, 98, 110, 124, 125, 134, 139, 145, 151, 152 또는 157로 이루어진 군으로부터 선택되는 공통 서열(consensus sequence)은 적어도 하나의 삽입(insertion), 하나의 결실(deletion) 및/또는 하나의 전이(transposition)를 포함하도록 변경될 수 있다. 일 구현에서, SEQ ID NOS: 5, 11, 15, 23, 28, 32, 47, 66, 75, 83, 90, 95, 98, 110, 124, 125, 134, 139, 145, 151, 152 또는 157로 이루어진 군으로부터 선택되는 공통 서열은 적어도 하나의 뉴클레오티드가 공통 서열 내로 삽입되도록 변경된다. 다른 구현에서, SEQ ID NOS: 5, 11, 15, 23, 28, 32, 47, 66, 75, 83, 90, 95, 98, 110, 124, 125, 134, 139, 145, 151, 152 또는 157로 이루어진 군으로부터 선택되는 공통 서열은 적어도 하나의 뉴클레오티드가 공통 서열로부터 결실되도록 변경된다. 다른 구현에서, SEQ ID NOS: 5, 11, 15, 23, 28, 32, 47, 66, 75, 83, 90, 95, 98, 110, 124, 125, 134, 139, 145, 151, 152 또는 157로 이루어진 군으로부터 선택되는 공통 서열은 적어도 하나의 뉴클레오티드가 공통 서열 내의 하나의 위치로부터 공통 서열 내의 다른 위치로 전이되도록 변경된다. SEQ ID NOS: 5, 11, 15, 23, 28, 32, 47, 66, 75, 83, 90, 95, 98, 110, 124, 125, 134, 139, 145, 151, 152 또는 157로 이루어진 군으로부터 선택되는 공통 서열은 진단 검정법에 유용성을 가지도록 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 충분한 친화력을 여전히 유지하면서 하나 또는 그 이상의 삽입, 결실 또는 전이의 조합을 포함하도록 변경될 수 있다는 것 또한 알려져 있다.

[0089]

다양한 구현에서, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 암타머는 표 4, 6, 8 또는 10에 나타낸 뉴클레오티드 서열 중 어느 하나에 포함된 연속된(contiguous) 뉴클레오티드의 서열과 동일한 인접 뉴클레오티드의 서열을 포함한다. 다양한 구현에서, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 암타머에서의 연속된 뉴클레오티드 서열은 표 4, 6, 8 또는 10에 나타낸 서열들 중 어느 하나에 포함된 연속된 뉴클레오티드 서열에서의 동일한 수의 뉴클레오티드와 동일한 임의의 수의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 다양한 구현에서, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 암타머에서의 연속된 뉴클레오티드 서열은 표 4, 6, 8 또는 10에 나타낸 서열들 중 어느 하나에 포함된 약 4 내지 약 30개의 연속된 뉴클레오티드 서열과 동일한 약 4 내지 약 30개의 연속된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예시적 구현에서, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 암타머는 표 4, 6, 8 또는 10에 나타낸 서열 중 어느 하나에 포함된 40개의 연속된 뉴클레오티드 서열과 동일한 40개의 연속된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예시적 구현에서, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 암타머는 표 4, 6, 8 또는 10에 나타낸 서열 중 어느 하나에 포함된 30개의 연속된 뉴클레오티드 서열과 동일한 30개의 연속된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 다른 예시적 구현에서, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 암타머는 표 4, 6, 8 또는 10에 나타낸 서열들 중 어느 하나에 포함된 20개의 연속된 뉴클레오티드 서열과 동일한 20개의 연속된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 또 다른 예시적 구현에서, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 암타머는 표 4, 6, 8 또는 10에 나타낸 서열들 중 어느 하나에 포함된 8개의 연속된 뉴클레오티드 서열과 동일한 8개의 연속된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 또 다른 예시적 구현에서, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 암타머는 표 4, 6, 8 또는 10에 나타낸 서열들 중 어느 하나에 포함된 4개의 연속된 뉴클레오티드 서열과 동일한 4개의 연속된 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0090]

일 구현에서, 독소 A에 대한 암타머는 SEQ ID NOS: 1-4, 6-10, 12-14, 16-22, 24-27 또는 29-31로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 다른 구현에서, 독소 A에 대한 암타머는 SEQ ID NOS: 5, 11, 15, 23 또는 28 중 어느 하나로부터 선택되는 공통 서열로부터 유래된다. 일 구현에서, 독소 A에 대한 암타머는 SEQ ID NOS: 1-31 중 어느 하나로부터 선택되는 공통 서열로부터 유래된다.

느 하나와 적어도 약 95% 동일하고, 적어도 약 90% 동일하고, 적어도 약 85% 동일하고, 적어도 약 80% 동일하고, 또는 적어도 약 75% 동일하다. 다른 구현에서, 독소 A에 대한 압타머는 SEQ ID NOS: 1-31 중 어느 하나 또는 이들 중 어느 하나의 단편과 적어도 약 95% 동일하고, 적어도 약 90% 동일하고, 적어도 약 85% 동일하고, 적어도 약 80% 동일하고, 또는 적어도 약 75% 동일하다. 다른 구현에서, 독소 A에 대한 압타머는 SEQ ID NOS: 1-31 또는 이것들 중 어느 하나의 단편 중 어느 하나로부터의 서열을 포함한다.

[0091] 일 구현에서, 독소 B에 대한 압타머는 SEQ ID NOS: 33-46, 48-65, 67-74, 76-82, 84-89, 91-94, 96-97 또는 99-108로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 또 다른 구현에서, 독소 B에 대한 압타머는 SEQ ID NOS: 32, 47, 66, 75, 83, 90, 95 및 98 중 어느 하나로부터 선택된 공통 서열로부터 유래된다. 다른 구현에서, 독소 B에 대한 압타머는 SEQ ID NOS: 32-108 중 어느 하나와 적어도 약 95% 동일하고, 적어도 약 90% 동일하고, 적어도 약 85% 동일하고, 적어도 약 80% 동일하고, 또는 적어도 약 75% 동일하다. 다른 구현에서, 독소 B에 대한 압타머는 SEQ ID NOS: 32-108 또는 이것들 중 어느 하나의 단편 중 어느 하나로부터의 서열을 포함한다.

[0092] 일 구현에서, 2성분 독소 A 사슬에 대한 압타머는 SEQ ID NOS: 109, 111-123, 126-133, 135-138, 140-144 또는 146-150으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 또 다른 구현에서, 2성분 독소 A 사슬에 대한 압타머는 SEQ ID NOS: 110, 124-125, 134, 139 또는 145 중 어느 하나로부터 선택되는 공통 서열로부터 유래된다. 일 구현에서, 2성분 독소 A 사슬에 대한 압타머는 SEQ ID NOS: 109-150 중 어느 하나와 적어도 약 95% 동일하고, 적어도 약 90% 동일하고, 적어도 약 85% 동일하고, 적어도 약 80% 동일하고, 또는 적어도 약 75% 동일하다. 다른 구현에서, 2성분 독소 A 사슬에 대한 압타머는 SEQ ID NOS: 109-150 또는 이것들 중 어느 하나의 단편 중 어느 하나로부터의 서열을 포함한다.

[0093] 일 구현에서, 2성분 독소 B 사슬에 대한 압타머는 SEQ ID NOS: 153-156, 158-162로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 또 다른 구현에서, 2성분 독소 B 사슬에 대한 압타머는 SEQ ID NOS: 151, 152 또는 157의 공통 서열로부터 유래된다. 일 구현에서, 2성분 독소 B 사슬에 대한 압타머는 SEQ ID NOS: 151-162 중 어느 하나와 적어도 약 95% 동일하고, 적어도 약 90% 동일하고, 적어도 약 85% 동일하고, 적어도 약 80% 동일하고, 또는 적어도 약 75% 동일하다. 다른 구현에서, 2성분 독소 B 사슬에 대한 압타머는 SEQ ID NOS: 151-162 또는 이것들 중 어느 하나의 단편 중 어느 하나로부터의 서열을 포함한다.

[0094] 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 압타머는 클로스트리디움 디피실 독소와 결합하는 부위 외에 임의의 수의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 다양한 구현에서, 압타머는 약 100까지의 뉴클레오티드, 약 95까지의 뉴클레오티드, 약 90까지의 뉴클레오티드, 약 85까지의 뉴클레오티드, 약 80까지의 뉴클레오티드, 약 75까지의 뉴클레오티드, 약 70까지의 뉴클레오티드, 약 65까지의 뉴클레오티드, 약 60까지의 뉴클레오티드, 약 55까지의 뉴클레오티드, 약 50까지의 뉴클레오티드, 약 45까지의 뉴클레오티드, 약 40까지의 뉴클레오티드, 약 35까지의 뉴클레오티드, 약 30까지의 뉴클레오티드, 약 25까지의 뉴클레오티드 및 약 20까지의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0095] 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 압타머는 각각의 독소에 대한 임의의 적절한 해리 상수 (dissociation constant)(K_d)를 가지도록 선택될 수 있다. 예시적 구현에서, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 압타머는 약 10nM 또는 그보다 작은 각각의 독소에 대한 해리 상수(K_d)를 가진다. 다른 예시적 구현에서, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 압타머는 약 15nM 또는 그보다 작은 각각의 독소에 대한 해리 상수(K_d)를 가진다. 여전히 다른 예시적 구현에서, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 압타머는 약 25nM 또는 그보다 작은 각각의 독소에 대한 해리 상수(K_d)를 가진다. 적절한 해리 상수는 멀티 포인트 적정(multi-point titration) 및 퍼팅 방정식 $y = (\text{최대(max)} - \text{최소(min)})(\text{단백질})/(K_d + \text{단백질}) + \text{분(min)}$ 을 사용하는 결합 분석법을 사용하여 측정될 수 있다. 해리 상수의 측정은 그것들이 측정될 조건에 매우 의존적이므로, 이 숫자들은 평형 시간 (quilibrium time) 등과 같은 인자에 대하여 매우 중요할 수 있다는 것으로 이해되어 진다. 다른 구현에서, 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 압타머는 표 4, 6, 8 및 10에 나타낸 서열들로부터 선택된 압타머의 K_d 보다 작거나 동일한 K_d 를 가지는 압타머이다.

[0096] 2성분 독소는 A 사슬 및 B 사슬로 이루어지기 때문에, 더욱 효율적인 결합은 이량체(dimeric) 또는 다른 다량체 (multimeric) 형태의 압타머를 사용함으로써 달성될 수 있다. 따라서, 다른 구현에서, 압타머는 표 8의 서열

및 표 10의 서열의 임의의 조합의 중합체(multimerization)이다. 2성분 독소에 대한 적절한 결합 특성을 가지는 임의의 압타머 서열에 대하여 동일한 전략이 사용될 수 있다. 다른 구현에서, A 사슬에 대한 압타머는 샌드위치 검정법에서 2성분 독소를 검출하기 위하여 B 사슬에 대한 압타머와 함께 사용될 수 있다.

[0097] 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 압타머를 포함하는 키트

본 발명은 임의의 본원에 기재된 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 압타머를 포함하는 키트를 제공한다. 이와 같은 키트는 예를 들어, (1) 적어도 하나의 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 대한 압타머, 및 (2) 용매 또는 용액과 같은 적어도 하나의 진단 테스트 시약(diagnostic testing reagent)을 포함한다. 추가적인 키트 성분은 선택적으로 예를 들어, (1) 적어도 하나의 용기, 바이알 또는 키트 성분을 담고/담거나 혼합하기 위한 유사한 기구, 및 (2) 클로스트리디움 디피실 독소의 존재가 테스트 될 샘플을 수집하기 위한 기구를 포함할 수 있다.

[0099] 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소를 검출하는 방법

본 발명은 클로스트리디움 디피실에 의해 생성된 독소에 결합하는 압타머와 시료를 접촉시키는 것을 포함하는, 시료에서 클로스트리디움 디피실 독소의 존재를 검출하는 방법을 제공하며, 여기에서 상기 독소는 독소 A, 독소 B, 2성분 독소 A 사슬 및 2성분 독소 B 사슬로부터 선택된다. 본 발명은 C-5 위치가 변경된 적어도 하나의 피리미딘을 포함하는 압타머를 포함하는 클로스트리디움 디피실 독소의 존재를 검출하는 방법을 더 개시하며, 여기에서 상기 C-5 위치가 변경된 적어도 하나의 피리미딘은 9에 나타낸 변경들 중 적어도 하나로부터 독립적으로 선택되는 C-5 변경을 포함한다. 본 발명은 또한 C-5 위치가 변경된 적어도 하나의 피리미딘을 포함하는 압타머를 포함하는 클로스트리디움 디피실 독소의 존재를 검출하는 방법을 개시하며, 여기에서 상기 C-5 위치가 변경된 적어도 하나의 피리미딘은 벤질카르복시아미드, 나프틸메틸카르복시아미드, 트립타미노카르복시아미드, 티로실카르복시아미드, 2-나프틸메틸카르복시아미드 및 폐네틸-1-카르복시아미드로부터 독립적으로 선택되는 C-5 변경을 포함한다. 본원에 기재된 클로스트리디움 디피실 독소를 검출하는 방법은 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경을 포함하는 압타머를 포함할 수 있고, 여기에서 상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 리보오스 위치(ribose position), 디옥시리보오스 위치(deoxyribose position), 포스페이트 위치(phosphate position) 및 염기 위치(base position)로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 위치에서의 화학적 치환이다. 게다가, 본원에 기재된 클로스트리디움 디피실 독소를 검출하는 방법은 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경을 포함할 수 있고, 여기에서 상기 적어도 하나의 추가적인 화학적 변경은 2'-위치 당변경(2'-position sugar modification), 2'-아미노(2'-NH₂)(2'-amino(2'-NH₂)), 2'-플루오로(2'-F)(2'-fluoro(2'-F)), 2'-0-메틸(2'-OMe)(2'-0-methyl(2'-OMe), 시토신 엑소시클릭 아민(cytosine exocyclic amine)에서의 변경, 5-브로모우라실(5-bromouracil)의 치환, 5-브로모디옥시우리딘(5-bromodeoxyuridine)의 치환, 5-브로모디옥시시티딘(5-bromodeoxycytidine)의 치환, 골격 변경(backbone modification), 메틸화(methylation), 3' 캡(3' cap) 및 5' 캡(5' cap)으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0100] 본 발명은 시료에서 클로스트리디움 디피실 독소의 존재를 검출하는 방법을 제공하며, 상기 검출 방법은 풀-다운 검정법, 점 블롯 검정법, PCR 검정법 또는 샌드위치 검정법으로부터 선택된다.

본 발명은 또한 SEQ ID NOS: 1-4, 6-10, 12-13, 16-22, 24-27 또는 29-31 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 압타머와 시료를 접촉시키는 것을 포함하는, 시료에서 클로스트리디움 디피실 독소 A의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 시료에서 클로스트리디움 디피실 독소 A의 존재를 검출하는 방법은 풀-다운 검정법, 점 블롯 검정법, PCR 검정법 또는 샌드위치 검정법을 포함할 수 있다. 클로스트리디움 디피실 독소 A의 존재를 검출하는데 사용되는 샌드위치 검정법은 압타머-표적-항체 검정법, 항체-표적-압타머 검정법 및 압타머-표적-압타머 검정법으로부터 선택될 수 있다. 시료에서 클로스트리디움 디피실 독소 A의 존재를 검출하는 방법은 독소 A의 정량적 측정값을 제공할 수 있다.

본 발명은 또한 SEQ ID NOS: 33-46, 48-65, 67-74, 76-82, 84-89, 91-94, 96-97 또는 99-108 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 압타머와 시료를 접촉시키는 것을 포함하는, 시료에서 클로스트리디움 디피실 독소 B의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 시료에서 클로스트리디움 디피실 독소 B의 존재를 검출하는 방법은 풀-다운 검정법, 점 블롯 검정법, PCR 검정법 또는 샌드위치 검정법을 포함할 수 있다. 클로스트리디움 디피실 독소 B의 존재를 검출하기 위하여 사용되는 샌드위치 검정법은 압타머-표적-항체

검정법, 항체-표적-암타며 검정법 및 암타며-표적-암타며 검정법으로부터 선택될 수 있다. 시료에서 클로스트리디움 디피실 독소 B의 존재를 검출하는 방법은 독소 B의 정량적 측정값을 제공할 수 있다.

[0104] 본 발명은 또한 SEQ ID NOS: 109, 111-123, 126-133, 135-138, 140-144 또는 146-150 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 암타며와 시료를 접촉시키는 것을 포함하는, 시료에서 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 A 사슬의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 시료에서 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 A 사슬의 존재를 검출하는 방법은 풀-다운 검정법, 점 블롯 검정법, PCR 검정법 또는 샌드위치 검정법을 포함할 수 있다. 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 A 사슬의 존재를 검출하기 위하여 사용되는 샌드위치 검정법은 암타며-표적-항체 검정법, 항체-표적-암타며 검정법 및 암타며-표적-암타며 검정법으로부터 선택될 수 있다. 시료에서 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 A 사슬의 존재를 검출하는 방법은 2성분 독소 A 사슬의 정량적 측정값을 제공할 수 있다.

[0105] 본 발명은 또한 SEQ ID NOS: 153-156, 158-162 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 암타며와 시료를 접촉시키는 것을 포함하는, 시료에서 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 B 사슬의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 시료에서 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 B 사슬의 존재를 검출하는 방법은 풀-다운 검정법, 점 블롯 검정법, PCR 검정법 또는 샌드위치 검정법을 포함할 수 있다. 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 B 사슬의 존재를 검출하기 위하여 사용되는 샌드위치 검정법은 암타며-표적-항체 검정법, 항체-표적-암타며 검정법 및 암타며-표적-암타며 검정법으로부터 선택될 수 있다. 시료에서 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 B 사슬의 존재를 검출하는 방법은 2성분 독소 B 사슬의 정량적 측정값을 제공할 수 있다.

[0106] 본 발명은 또한 SEQ ID NOS: 5, 11, 15, 23, 28, 32, 47, 66, 75, 83, 90, 95, 98, 110, 124-125, 134, 139, 145, 151-152 및 157 또는 그것들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 공통 서열을 포함하는 암타며와 시료를 접촉시키는 것을 포함하는, 시료에서 클로스트리디움 디피실 독소의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 시료에서 이러한 공통 서열을 포함하는 암타며를 사용하여 클로스트리디움 디피실 독소의 존재를 검출하는 방법은 풀-다운 검정법, 점 블롯 검정법, PCR 검정법 또는 샌드위치 검정법을 포함할 수 있다. 클로스트리디움 디피실 독소의 존재를 검출하기 위하여 사용되는 샌드위치 검정법은 암타며-표적-항체 검정법, 항체-표적-암타며 검정법 및 암타며-표적-암타며 검정법으로부터 선택될 수 있다. 시료에서 클로스트리디움 디피실 독소의 존재를 검출하는 방법은 이러한 클로스트리디움 디피실 독소의 정량적 측정값을 제공할 수 있다.

0107] 실시예

[0108] 하기 실시예들은 단지 설명을 위하여 제공되는 것일 뿐, 첨부된 청구항에 의해 정의된 것과 같은 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다. 본원에 기재된 모든 실시예들은 당업자들에게 잘 알려져 있고 통상적인 표준 기술을 사용하여 수행된다. 하기 실시예에 기재된 통상적인 문자 생물학 기술들은 샘브록 등과 같은 표준 실험실 매뉴얼에 기재된 것과 같이 수행될 수 있다(Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (2001)).

0109] 실시예 1: 클로스트리디움 디피실 독소 A/B 및 2성분 독소를 사용하는 SELEX: 표적의 입수

0110] 표적의 입수

[0111] 클로스트리디움 디피실 계놈 DNA로부터 원하는 유전자 단편의 PCR 증폭, Strep-tag 및 His-tag 서열 사이의 벡터 pET-51b 안으로 프레임 내(in frame) 클로닝 및 대장균 로제타(*E.coli* Rosetta)에서의 과발현에 의해 SELEX에 적합한 표적을 제조하였다(표 1). 독소 A에 대하여, 카르복시-말단 베타-헤어핀 반복서열(carboxy-terminal β -hairpin repeats) 17-32로 이루어진 재조합 폴리펩티드를 얻었다. 이 독소 도메인은 결정 구조가 단지 5개의 수용체-결합 반복서열의 독소 A 웹티드와 유사한 것으로 공개되어 있기 때문에 선택되었다(Ho, J.G., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005. 102(51): p. 18373-8). 독소 B에 대하여, 아미노-말단 촉매 도메인(amino-terminal catalytic domain)을 정제하여 이 도메인의 결정 구조를 얻었다(Reinert, D.J., *et al.*, J. Mol. Biol., 2005. 351(5): p. 973-81). 2성분 독소에 대하여, 예상되는 신호 서열이 없는 전장 CdtA 서브유닛(full-length CdtA subunit)을 재조합 형태로 제조하였고(crystal structure available (Sundriyal, A., *et al.*, J. Biol. Chem., 2009. 284(42): p. 28713-9)), 아마 CdtB 전구체 단백질로부터 절단된 소위 활성 도메인(activation domain)을 나타내는 CdtB 단편(아미노산 잔기 30-207)을 제조하였다(Perelle, S., *et al.*,

Infect. Immun., 1997. 65(4): p. 1402-7).

[0112] 이용 가능한 결정 구조와 함께 모든 클로스트리디움 디피실 독소의 클로닝 및 정제를 도 1a-1d에 나타내었다. 재조합 이중 태그된 단백질을 표준 프로토콜을 이용하여 Ni-NTA 아가로오스 및 스트렙트액틴 아가로오스 (streptactin agarose) 상에서 친화 크로마토그래피를 통하여 정제하였다.

[0113] 클로닝 및 과발현을 위한 클로스트리디움 디피실 독소 유전자의 PCR 증폭

표 1

PCR 증폭		표적 단백질			
유전자	PCR 프라이머	앰플리콘 (뉴클레오티드)	단백질 (UniProt)	도메인 (잔기)	크기 (kDa) (태그됨)
<i>tcDA</i>	<i>tcDA-6 + tcDA-2</i>	6751-8127	Toxin A (TOXA_CLODI)	2250-2709	57.1
<i>tcDB</i>	<i>tcDB-5 + tcDB-7</i>	1-1638	Toxin B (TOXB_CLODI)	1-546	68.8
<i>cdtA</i>	<i>cdtA-1 + cdtA-2</i>	103-1387	Binary Toxin A (O32738_CLODI)	35-463	54.7
<i>cdtB</i>	<i>cdtB-15 + cdtB-16</i>	90-622	Binary Toxin B (O32739_CLODI)	30-207	26.0
SEQ ID NO: 프라이머 프라이머 서열 (밑줄 친 클로닝을 위한 제한 부위)					
163	<i>tcDA-6</i>	<u>GCGCAAGCTTCTCAAAATGGATATATTACTATTGAAAG</u>			
164	<i>tcDA-2</i>	<u>GCGCGAGCTCCATATATCCCAGGGGCTTTAC</u>			
165	<i>tcDB-5</i>	<u>GCGCAAGCTTATGAGTTAGTTAATAGAAAACAGTTAG</u>			
166	<i>tcDB-7</i>	<u>GCGCGAGCTCCATCTCACCAAGAGAACCTTC</u>			
167	<i>cdtA-1</i>	<u>GCGCAAGCTTCAAGACTTACAAAGCTATAGTG</u>			
168	<i>cdtA-2</i>	<u>GCGCGAGCTCAGGTATCAATGTTGCATCAAC</u>			
169	<i>cdtB-15</i>	<u>GCGCAAGCTTCAAACTAGTACAAGTAATC</u>			
170	<i>cdtB-16</i>	<u>GCGCGAGCTCGGTCAAAGAAATTGTTATTGGG</u>			

[0114]

[0115] 실시예 2: 클로스트리디움 디피실 독소 A/B 및 2성분 독소를 이용한 SELEX: SELEX 및 풀(pool) 친화력

[0116] Dynabeads[®] (Talon[®] 또는 His-tag) 분리(partitioning)를 사용하여 정제된 His-태그된 단백질을 이용한 SELEX를 수행하였다. dU 대신에 6개의 변경된 뉴클레오티드인 5-티로실카르복시아미드-dU(TyrdU), 5-벤질카르복시아미드-dU(BndU), 5-나프틸메틸카르복시아미드-dU(NapdU), 5-트립타미노카르복시아미드-dU(TrpdU), 5-(2-나프틸메틸)카르복시아미드(2NapdU) 또는 5-페네틸-1-카르복시아미드(PEdU) 중 하나를 포함하는 40mer 랜덤 서열 라이브러리를 사용하였다. 7 라운드 또는 8 라운드의 선별을 수행하였고, 2-8 라운드에서 텍스트란 설레이트를 사용한 동적 유발을 적용하였다.

[0117] 필터 결합 검정법으로 SELEX의 최종 라운드 후 얻어진 암타머 풀을 그것들의 표적에 대한 친화력에 대하여 테스트하고, K_d 와 플라토를 측정하였다(표 2). 독소 A에 대하여, 암타머 풀 4943(TrpdU)은 $K_d = 2.42\text{nM}$ 로 우수한 친화력을 가졌다. 풀 4936(TyrdU) 및 4939(NapdU)는 각각 11.5nM 의 K_d 및 10.8nM 의 K_d 로 활성이 있었다. 풀 5564(2NapdU) 및 5577(2NapdU) 또한 4.63nM 의 K_d 및 6.40nM 의 K_d 로 활성이 있었다. 독소 A에 대하여, 암타머 풀 5570(PEdU)은 $K_d = 1.61\text{nM}$ 로 가장 우수하였다.

[0118] 독소 B에 대하여, 암타머 풀 TyrdU, BndU, NapdU, TrpdU, 2NapdU 및 PEdU는 $0.11\sim1.11\text{nM}$ 범위의 K_d 로 탁월한

친화력을 나타내었다.

[0119] 2성분 독소 A 사슬 또한 고친화력 암타머를 선별하는데 성공하였으며, 풀 4758(TrpdU)는 $K_d = 0.40\text{nM}$; 풀 5567(2NapdU)는 $K_d = 0.19\text{nM}$; 및 풀 5574(PEdU)는 $K_d = 0.30\text{nM}$ 을 나타내었다. 2성분 독소 B 사슬은 $K_d = 7.58\text{nM}$ 의 활성 풀 5556(2NapdU)을 선별하는데 사용되었다.

[0120] 충분한 친화력(~10nM 또는 그 이하의 K_d)을 가지는 모든 풀을 클론하고, 풀당 적어도 48개 클론의 서열을 알아내었다.

[0121] 클로스트리디움 디피실 독소를 이용한 SELEX

표 2

표적	라이브러리	MOD	샘플 ID	풀	K_d (nM)	플라토
독소 A	40N29.14	TyrdU,	S247-R8-S1	4936	11.50	42%
		BndU	S247-R8-S9	n/a ¹	70.30	40%
		NapdU	S247-R8-S17	4939	10.80	48%
		TrpdU	S247-R8-S25	4943	2.42	46%
	40N32.24	2NapdU	S270-R8-S1	5564	4.63	42%
		PEdU	S270-R8-S9	5570	1.61	21%
		2NapdU	S270-R8-S29	5577	6.40	23%
	40N29.14	TyrdU,	S247-R8-S3	4937	0.57	43%
		BndU	S247-R8-S11	4938	1.11	24%
		NapdU	S247-R8-S19	4940	0.20	44%
		TrpdU	S247-R8-S27	4944	0.24	43%
	40N32.24	2NapdU	S270-R8-S5	5566	0.11	18%
		PEdU	S270-R8-S13	5573	0.12	50%
		2NapdU	S270-R8-S30	5578	0.79	16%
2성분 독소	40N58.50	TrpdU	S239-R7-S39	4758	0.40	50%
A 사슬	40N32.24	2NapdU	S261-R8-S24	5551	0.22	36%
		PEdU	S261-R8-S32	5555	3.73	33%
		2NapdU	S270-R8-S6	5567	0.19	45%
		PEdU	S270-R8-S14	5574	0.30	65%
		2NapdU	S270-R8-S31	5579	0.33	63%
2성분 독소	40N32.24	2NapdU	S261-R8-S33	5556	7.58	32%
B 사슬						

[0122]

¹ 불충분한 친화력 때문에 클로닝하지 않음

[0124] 실시예 3: 독소 A 암타머 클론

[0125] SELEX 풀 4936(TyrdU), 4939(NapdU), 4943(TrpdU), 5564(2NapdU), 5577(2NapdU) 및 5570(PEdU)로부터 얻은 각

각의 클론들을 필터 결합 검정법으로 독소 A에 대한 친화력에 대하여 평가하였다. 거의 모든 클론들이 선별을 위하여 사용된 재조합 57.1 kDa 독소 A 단편에 대하여 우수한 친화력을 가지지만, 단지 몇몇의 클론들은 천연의 308 kDa 독소 A에 대해서만 친화력을 나타내었다. 이는 몇몇의 더 작은 재조합 단백질 상의 에피토프에 대한 전장의 천연 독소의 압타머 결합이 가능하지 않기 때문일 수 있으므로, 놀랍지 않다.

[0126] 결합 곡선의 친화력(K_d) 및 플라토를 표 3에 나타내었으며, 해당 서열을 표 5에 열거하였고, 가장 우수한 클론을 볼드체로 나타내었다.

[0127] 풀 4936(TyrdU)으로부터의 클론: 클론 4936-4는 풀에 있는 서열의 20%에 해당하며, 재조합 독소 A 도메인에 대하여 $K_d = 3.8\text{nM}$, 천연 독소 A에 대하여 $K_d = 14.5\text{nM}$ 로 가장 활성이 있었다.

[0128] 풀 4939(NapdU)로부터의 클론: 세 개의 관련없는 서열들이 이 풀에서 각각 5배로 발견되었다. 클론 4939-280은 재조합 단백질에 대하여 $K_d = 2.34\text{nM}$, 천연 독소 A에 대하여 $K_d = 15.3$ 으로 이 풀에서 가장 활성이 있는 클론이었다.

[0129] 풀 4943(TrpdU)으로부터의 클론: 천연 독소 A에 대하여 우수한 친화력(낮은 나노몰 단위)을 가지는 네 개의 클론이 이 풀에서 발견되었다. 가장 우수한 클론인 4943-51(천연 독소 A에 대하여 $K_d = 1.78$)은 이 풀에 있는 모든 서열의 19%를 이룬다. 다른 세 개의 클론은 공통 모티프(common motif) NNANAnnCNNNCnnCnN ($N = \text{TrpdU}$; $n = A, G, C, \text{ or } \text{TrpdU}$)를 갖는다. 랜덤 영역 내에 보통 40개 대신 32개의 뉴클레오티드만을 가진 클론 4943-50, 4943-60 및 4943-49는 우수한 친화력을 나타내었다(각각 천연 독소 A에 대하여 5.60nM , 4.57nM 및 7.91nM 의 K_d).

[0130] 풀 5564(2NapdU)로부터의 클론: 이 풀의 가장 활성이 있는 클론은 5564-49였다(천연 독소 A에 대하여 1.78nM 의 K_d). 각각 세 개의 서열 패턴 NAAAGNAGGN, GNNRNCMKNCNGA (SEQ ID NO: 15) 또는 CGGGNCNGACAGANGCA ($N = 2\text{NapdU}$; $R = A \text{ or } G$; $M = A \text{ or } C$; $K = G \text{ or } N$) 중 하나를 공유하는 몇몇의 다른 클론들 또한 이 풀에 존재하였다.

[0131] 풀 5570(PEdU)로부터의 클론: 재조합 독소 A에 대하여 $K_d = 0.12\text{nM}$, 천연 독소 A에 대하여 $K_d = 6.91$ 인 주요한 클론인 5570-54는 이 풀에서 가장 풍부한 서열(abundant sequence)이었다.

[0132] 풀 5577(2NapdU)로부터의 클론: 활성 클론은 패턴 NACCGAACGNnnNCAGNCNGA의 전부 또는 일부를 공유한다($N = 2\text{NapdU}$; $n = A, G, C \text{ or } 2\text{NapdU}$). 이들 서열은 경쟁 독소 A 압타머(4943-51)가 표적 단백질 농도에 대하여 두 배 정도 초과하여 존재하는 특정 SELEX에서 선별되었다.

[0133] 클로스트리디움 디피실 독소 A를 이용한 SELEX로부터의 압타머 클론의 친화력

표 3

독소 A (TOXA_CLODI)			재조합 단백질에 대한 친화력		성숙 단백질에 대한 친화력	
압타머		친화력			(천연 표적)	
클론 ID	압타머-ID	MOD	K _d (nM)	플라토	K _d (nM)	플라토
247-8-1-1	4936-1_0	TyrdU	17.0	33%		
247-8-1-3	4936-3_0	TyrdU	23.9	27%		
247-8-1-4	4936-4_0	TyrdU	3.80	37%	14.5	29%
247-8-1-9	4936-9_0	TyrdU	33.3	11%		
247-8-1-13	4936-13_0	TyrdU	25.7	45%		
247-8-1-18	4936-18_0	TyrdU	74.5	36%		
247-8-1-32	4936-32_0	TyrdU	19.9	40%		
247-8-17-195	4939-195_0	NapdU	23.3	9%	>100	2%
247-8-17-196	4939-196_0	NapdU	8.63	34%	61.6	37%
247-8-17-194	4939-194_0	NapdU	20.5	8%		
247-8-17-280	4939-280_0	NapdU	2.34	28%	15.3	30%
247-8-17-281	4939-281_0	NapdU	1.35	24%	>100	0%
247-8-17-209	4939-209_0	NapdU	11.4	27%	202	55%
247-8-17-202	4939-202_0	NapdU	13.2	34%	104	50%
247-8-17-246	4939-246_0	NapdU	12.5	34%	58.4	31%
247-8-25-49	4943-49_0	TrpdU	1.39	49%	7.91	43%
247-8-25-50	4943-50_0	TrpdU	2.81	36%	5.60	54%
247-8-25-51	4943-51_0	TrpdU	1.23	43%	1.78	54%
247-8-25-60	4943-60_0	TrpdU	2.65	46%	4.57	46%
247-8-25-71	4943-71_0	TrpdU	6.26	18%		
247-8-25-73	4943-73_0	TrpdU	0.82	13%		
247-8-25-91	4943-91_0	TrpdU	0.43	10%		
270-8-1-49	5564-49_0	2NapdU	1.13	30%	1.78	11%
270-8-1-50	5564-50_0	2NapdU	6.99	31%	>100	0%
270-8-1-52	5564-52_0	2NapdU	1.86	41%	19.30	20%
270-8-1-58	5564-58_0	2NapdU	6.29	43%	46.00	25%
270-8-1-65	5564-65_0	2NapdU	2.80	20%	>100	1%
270-8-1-84	5564-84_0	2NapdU	2.87	46%	>100	1%
270-8-1-89	5564-89_0	2NapdU	3.40	34%	11.90	17%
270-8-1-66	5564-66_0	2NapdU	7.17	41%	>100	2%
270-8-1-161	5564-161_0	2NapdU	2.71	67%	6.15	12%
270-8-9-50	5570-50_0	PEdU	4.87	23%	>100	0%
270-8-9-54	5570-54_0	PEdU	0.12	24%	6.91	8%
270-8-29-1	5577-1_0	2NapdU	1.59	48%	4.97	21%
270-8-29-3	5577-3_0	2NapdU	1.73	39%	5.52	22%
270-8-29-12	5577-12_0	2NapdU	6.48	53%	12.90	19%

[0134]

표 4는 클로스트리디움 디피실 독소 A 압타머 클론이다. 주요 서열은 볼드체로 된 그것들의 "압타머 ID No."를 가지고, 공통 서열은 라벨 "서열 패턴(Sequence Pattern)" 아래에 밑줄로 나타내었다. 기본 대문자 "N"은 특정 폴(TyrdU, NapdU, TrpdU, 2NapdU 또는 PEdU)에 대하여 표시한 것으로서 변경된 뉴클레오티드를 나타낸다. 공통 서열에서 기본 소문자 "n"은 A, G, C로부터 선택된 모티프 내의 가변성 염기(variable base) 또는 특정 폴(TyrdU, NapdU, TrpdU, 2NapdU 또는 PEdU)에 대한 변경된 뉴클레오티드를 나타낸다. IUPAC 뉴클레오티드 모호성 코드는 M = A 또는 C; R = A 또는 G; K = G 또는 N으로 사용되었고(N은 폴-특이적(pool-specific)으로 변경된 dU를 나타냄), 공통성(consensus)을 정의하기 위하여 90%의 컷-오프(cut-off) 표현을 사용하였다.

豆 4

실시예 4: 돌소 B 암타며 클록

독소 B에 대한 암타머의 친화력을 일반적으로 매우 우수하며, SELEX에 사용된 클로스트리디움 디피실 독소 B 단편의 68.8 kDa 아미노-말단 촉매 도메인과 270 kDa 천연의 전장 독소 B 간에 밀접한 관계가 있다. 독소 B에 대하여 서브 나노몰 단위의 K_d 를 가지는 암타머 클론을 TyrdU, BndU, NapdU, TrpdU, 2NapdU 및 PEdU 변경된 뉴클레오티드(표 5)를 가지는 모든 풀로부터 분리하고; 클로스트리디움 디피실 독소 B 암타머의 서열들을 표 6에 열거하였으며, 가장 우수한 클론을 볼드체로 나타내었다.

풀 4937(TyrdU)로부터의 클론: TyrdU 암타머의 정렬(alignments)는 두 개의 구별되는 서열 패턴(YNNSSNGAAW (SEQ ID NO: 32), YGAAWN (SEQ ID NO: 47)), (N = TyrdU; W = A 또는 N; S = C 또는 G; Y = C 또는 N) 뿐만 아니라 하나의 회귀 서열(orphan sequence)의 존재를 나타내었다.

풀 4938(BndU)로부터의 클론: 이 풀은 세 개의 관련없는 서열들을 포함하고 있으며, 모두 다중 카피(multiple copies)로 존재하였다.

풀 4940(NapDÜ)으로부터의 클론: 네 개의 주요 클론을 포함하는, 가장 풍부한 서열은 패턴 KSGANNGRW (SEQ ID

NO: 66) (N = NapdU; R = A 또는 G; W = A 또는 N; S = C 또는 G; K = G 또는 N) 모두 또는 일부를 포함한다. 게다가, 세 개의 관련없는 희귀 서열이 존재하였다.

[0142] 풀 4944(TrpdU)로부터의 클론: 대부분의 서열들이 패턴 NnCYnnnNCNNnAARWNMAMSYN (SEQ ID NO: 75)을 포함하였고; 두 개의 다른 서열들은 서로 다른 패턴, CNnGnANCNGGAAAN, (N = TrpdU; n = A, G, C 또는 TrpdU; M = A 또는 C; R = A 또는 G; W = A 또는 N; S = C 또는 G; Y = C 또는 N)을 공유하고, 네 개의 희귀 서열 또한 존재하였다.

[0143] 풀 5566(2NapdU)으로부터의 클론: 패턴 AnCnNNNAAGNGAACNNNnAnnnnnnnnnGnGNnANA (N = 2NapdU; n = A, G, C 또는 2NapdU)을 한 쌍의 클론에서 발견하였다. 이 풀은 다중 카피로 두 개의 추가적인 관련없는 서열들을 포함하고 있었다.

[0144] 풀 5573(PEdU)으로부터의 클론: 두 개의 패턴 GCCNNNCNNGNAAACGNCCNNGANGGCAGCGNN 및 AGNNNGANCCC (N = PEd U)을 확인하였다. 6개의 추가적인, 관련없는 클론들이 존재하고 있었다.

[0145] 풀 5578(NapdU)로부터의 클론: 두 개의 활성 클론이 다중 카피로 존재하고 있었다. 이 서열들은 경쟁하는 독소 B 암타머(4940-23)가 표적 단백질 농도에 대하여 두 배 정도 초과하여 존재하는 특정 SELEX에서 선별되었다.

[0146] NapdU 또는 TrpdU 변경 뉴클레오티드로 가장 높은 친화력의 암타머를 클로닝하였다. 다섯 개의 암타머들은 천연 독소 B에 대하여 0.1 미만의 매우 낮은 K_d 를 나타내었다.

[0147] 클로스트리디움 디피실 독소 B를 이용한 SELEX로부터 얻은 암타머 클론의 친화력

표 5

독소 B (TOXB_CLODI)		재조합 단백질에 대한 친화력			성숙 단백질에 대한 친화력	
클론 ID	압타머-ID	압타머	친화력 (SELEX 표적)	(천연 표적)		
247-8-3-49	4937-49_0	TyrdU	0.19	23%	0.16	6%
247-8-3-50	4937-50_0	TyrdU	0.36	26%	0.27	4%
247-8-3-51	4937-51_0	TyrdU	0.60	31%	1.07	14%
247-8-3-55	4937-55_0	TyrdU	0.15	39%	0.15	15%
247-8-3-57	4937-57_0	TyrdU	0.15	35%	0.12	11%
247-8-3-66	4937-66_0	TyrdU	0.63	34%	0.59	14%
247-8-3-67	4937-67_0	TyrdU	0.11	21%	0.23	16%
247-8-3-81	4937-81_0	TyrdU	0.23	19%	0.28	13%
247-8-3-85	4937-85_0	TyrdU	0.27	32%	0.72	25%
247-8-3-94	4937-94_0	TyrdU	0.27	27%	0.36	12%
247-8-11-1	4938-1_0	BndU	0.84	23%	2.03	20%
247-8-11-6	4938-6_0	BndU	1.02	16%	1.52	17%
247-8-11-17	4938-17_0	BndU	0.36	32%	0.50	16%
247-8-19-1	4940-1_0	NapdU	0.04	24%	0.06	14%
247-8-19-3	4940-3_0	NapdU	1.04	27%	0.67	12%
247-8-19-6	4940-6_0	NapdU	0.05	15%	0.43	7%
247-8-19-8	4940-8_0	NapdU	0.19	33%	0.27	10%
247-8-19-19	4940-19_0	NapdU	0.11	23%	0.14	8%
247-8-19-23	4940-23_0	NapdU	0.07	37%	0.09	13%
247-8-19-27	4940-27_0	NapdU	0.10	34%	0.09	12%
247-8-27-1	4944-1_0	TrpdU	0.20	26%	0.13	10%
247-8-27-4	4944-4_0	TrpdU	0.10	29%	0.16	11%
247-8-27-5	4944-5_0	TrpdU	0.08	33%	0.09	10%
247-8-27-9	4944-9_0	TrpdU	0.18	36%	0.14	9%
247-8-27-11	4944-11_0	TrpdU	0.14	24%	0.22	6%
247-8-27-14	4944-14_0	TrpdU	0.24	20%	0.70	9%
247-8-27-20	4944-20_0	TrpdU	0.12	25%	0.18	7%
247-8-27-30	4944-30_0	TrpdU	0.06	28%	0.08	9%
247-8-27-34	4944-34_0	TrpdU	0.07	35%	0.41	10%
270-8-5-53	5566-53_0	2NapdU	0.02	5%	0.22	15%
270-8-5-74	5566-74_0	2NapdU	0.04	6%	0.25	21%
270-8-5-77	5566-77_0	2NapdU	NT	NT	0.23	6%
270-8-13-2	5573-2_0	PEdU	0.03	33%	0.11	15%
270-8-13-3	5573-3_0	PEdU	0.04	52%	0.25	12%
270-8-13-4	5573-4_0	PEdU	0.03	54%	0.08	12%
270-8-13-5	5573-5_0	PEdU	0.06	49%	0.55	14%
270-8-13-9	5573-9_0	PEdU	0.01	45%	0.14	13%
270-8-13-11	5573-11_0	PEdU	6.82	36%	2.70	8%
270-8-13-14	5573-14_0	PEdU	0.04	21%	0.33	9%
270-8-13-23	5573-23_0	PEdU	1.49	35%	0.55	9%
270-8-13-24	5573-24_0	PEdU	0.02	33%	0.11	10%
270-8-30-66	5578-66_0	2NapdU	0.98	14%	NT	NT
270-8-30-73	5578-73_0	2NapdU	1.62	18%	NT	NT

[0148]

표 6은 클로스트리디움 디피실 독소 B 압타머 클론이다. 주요 서열(lead sequence)은 볼드체로 된 그것들의 "압타머 ID No."를 가지고, 공통 서열은 라벨 "서열 패턴(Sequence Pattern)" 아래에 밑줄로 나타내었다. 기본 대문자 "N"은 특정 폴(TyrdU, BndU, NapdU, TrpdU, 2NapdU 또는 PEdU)에 대하여 표시한 것으로서 변경된 뉴클레오티드를 나타낸다. 공통 서열에서 기본 소문자 "n"은 A, G, C로부터 선택된 모티프 내의 가변성 염기(variable base) 또는 특정 폴(TyrdU, BndU, NapdU, TrpdU, 2NapdU 또는 PEdU)에 대한 변경된 뉴클레오티드를 나타낸다. IUPAC 뉴클레오티드 모호성 코드는 M = A 또는 C; R = A 또는 G; W = A 또는 N; S = C 또는 G; Y = C 또는 N; K = G 또는 N으로 사용되었고(N은 폴-특이적(pool-specific)으로 변경된 dU를 나타냄), 공통성 (consensus)을 정의하기 위하여 90%의 컷-오프(cut-off) 표현을 사용하였다.

표 6

Clones from Pool 4937 (TyrdU)					
SEQ ID NO.	Aptamer ID No.	Count	Pct	Sequence Pattern	
				YNNSSNGAAW	
33	4937-50	6	8%	NANNCCNNAAGCCNGNGAAAACCGCNNNCGGNNCG	
34	4937-51	3	4%	NGGACACNANCCNCCCCACNNNNCGNGAACNNAGNN	
35	4937-53	2	3%	NGGANCACGNANNCCACNNACNNCCNGAAANAGCANN	
36	4937-54	4	5%	ACNNGNGAAANNACACNNNGCCAGCANCNANNCCGCN	
37	4937-56	2	3%	NNGGCACGAAGNNNGACNNNGAANNGCNGAAACANCNNNN	
38	4937-57	5	6%	NGGACACNNACAGCNCNGAAANNGCANN	
39	4937-61	2	3%	GNGCNGCCANCNANCNCNNANGAANCCGAANNCC	
40	4937-63	2	3%	NCCANNCCACCGCGNGCCACAGNANCNGAANNGCNGAAN	
41	4937-74	2	3%	NCCNANCNCNNCGNAANCCGAANNGCCNACNGCCNN	
42	4937-78	2	3%	NCACAAACNACCGNNCCNGNGAANNNCNAANNNCNGGN	
43	4937-81	4	5%	NACNANCACGNNNNNGNGAANNGCAGANCCGGAGGN	
44	4937-86	1	1%	AGGCAGGNCNNCANANCCGCAANNGAANGCACGCNNCC	
45	4937-87	2	3%	GNGACAAACNANGNNANCNGNAANCCGAANNGCCGN	
46	4937-94	4	5%	CACACNANNCCNACCANGAANNGNGAAANAGCANN	
				Sequence Pattern	
				YGAWIN	
48	4937-85	1	1%	CNAACNGAANACNGAGCAACANCCGCANNGCGA	
49	4937-61	2	3%	GNGCNGCCANCNANCNCNNANGAANCCGAANNCC	
50	4937-74	2	3%	NCCNANCNCNNCGNAANCCGAANNGCCNACNGCCNN	
51	4937-87	2	3%	GNGACCAACNANGNNANCNGNAANCCGAANNGCCGN	
52	4937-55	12	16%	AACCCNGNANNCCACCCNGCCGAAANNGANNNCNGN	
53	4937-52	2	3%	ACCANGNANNACCCNCCNNGCCGAAANCAGANN	
54	4937-81	4	5%	NACNANCACGNNNNNGNGAANNGCAGANCCGGAGGN	
55	4937-49	4	5%	NCNANNCCCCGAGNCNNGANANCCACGANN	
56	4937-56	2	3%	NNGGCACGAAGNNNGACNNNGAANNGCNGAAACANCNNNN	

[0150]

57	4937-78	2	3%	NCACAAACNANCCGNNCNNNGNGAANNCAANNNCNGGN
58	4937-73	2	3%	NCNAACCGNNCGCANNACANGAAANNAGGAGGACANCG
59	4937-96	1	1%	GAGCNAANNGAAGCNACAGGACNCNNNGGCACGCGGNNA
60	4937-53	2	3%	NGGANCACGNANNCCACNNACNNCCNGAANAGCANN
61	4937-66	4	5%	GGNCNCANCAGACAANNNNGGAANGNGCAGACACNACGN
62	4937-67	1	1%	GGGCNCAGNANCNGCAGAGCCAGNAGAACAGGNGN (orphan)
Clones from Pool 4938 (BndU)				
SEQ ID NO.	Aptamer ID No.	Count	Percent	Sequence Pattern
63	4938-1	5	10%	NNGGCGCCGNNGCGGNANGACNCNNNNNNNANGCNG
64	4938-6	4	8%	AGNGCNAGGCACNCCGGNACNACNNCNCCNACNAGN
65	4938-17	3	6%	NANAAAGANCNNCCNNNGNAANNCCNCANGACANAAANA
Clones from Pool 4940 (NandU)				
SEQ ID NO.	Aptamer ID No.	Count	Percent	Sequence Pattern
				KSGANNGGRW
67	4940-1	9	20%	NCCNNNGCGAANCGGGANNGGANACGGNNGGCAANAGN
68	4940-23	4	9%	AGGCNCAANGNGNANCAGANNGGAAGCAGNNAANCAGN
69	4940-19	2	5%	GCGNCAGNNGNNGGANNGGAGNGGAANNAGGNAGCA
70	4940-31	1	2%	NGGGNCNCAAGNNNGNNGCCANNGGANNGGAAGNCCN
71	4940-6	2	5%	CCCGCGCNGANNNGCAANNAGCACGGCNGNCGGNGAACN
72	4940-3	1	2%	NCCANCAGGACCAACNNAGCNCAGCAGGGACNGNC (orphan)
73	4940-8	1	2%	NANCAGACCNCANCAGCAGCACNNANGAGNNGAACACGA (orphan)
74	4940-27	1	2%	NANNNGNCCANCCACNNAAANGCNAGCACACGNNAACA (orphan)

[0151]

Clones from Pool 4944 (TrpdU)				
SEQ ID NO.	Aptamer ID No.	Count	Pct	Sequence Pattern
				NnCYnnNCNNnAARWNMAMSYN
76	4944-1	2	4%	CANGNCNCAANCNNNAAGANAACGNGACCGCGAGNACCG
77	4944-13	4	9%	NGCNGACAGACACANGNCCCCNCNCNNAAAGANAACGNNG
78	4944-40	1	2%	ANACACCCCN>NNNAAGANAACGNNCGGACCGCGCGANAA
79	4944-14	4	9%	NCNGCNANGNCNNNAAGANCAACCNAAGAGANGCANGANA
80	4944-23	1	2%	GNNGGAGCGNNGGGCNNACCNNACNGGANCNGAACCCN
81	4944-11	5	11%	GNCGANCNNCAAANNANGNACGANNACCCNAACANGGNAC
82	4944-34	10	22%	NGGNNAAGCACNNCANNCAANGGACCANANAACNCNAGNNAA
				Sequence Pattern
83				CnGnANCNGGAAN
84	4944-17	2	4%	ACNNNNCGCACCCGGCCNNANGCCNNGCANNGGAAANGG
85	4944-4	1	2%	NNNNCGGAAGCCGCNNACCGCCACNCGANCNGGAAAN
86	4944-5	1	2%	NGNCGAGNAACCGCGACCGNNNCCCNNGNAGNAACNACA (orphan)
87	4944-9	1	2%	NGNNNCAACNANGAANCCAGCNACCGNGCAACCAANGNA (orphan)
88	4944-30	1	2%	AGNGNAANAGNAACCCNNAGACNANGCCNNGGNANC GG (orphan)
89	4944-20	1	2%	NGCGGCNGAAGAAGCANGCAAGNCANC GGNCNNNGGN (orphan)
				Clones from Pool 5566 (2NpdU)
SEQ ID NO.	Aptamer ID No.	Count	Pct	Sequence Pattern
90				AnCnNNNAAGNGAACNNnAnnnnnnnnnGnGNNnANA
91	5566-53	3	7%	CCAGCANNNAAGNGAACNNNAAGGAAGGGAGGGAGNNCANA
92	5566-90	1	2%	AGACCGNNNAAGNGAACNNCAACGGGANGCGNGNNAANA
93	5566-74	4	9%	AGNGGCGNNAANGCANNNAAACGAGCACNGAGGGCGNNAANA
94	5566-77	3	7%	CNNNNNNACCGCNGCANGACNNAGCGCAGNCNGNNG
				Clones from Pool 5573 (PEdU)
SEQ ID NO.	Aptamer ID No.	Count	Pct	Sequence Pattern
95				GCCNNNCNNGNAAACGNCCNNGANGGCAGCGNN
96	5573-23	2	5%	GAACGN GCCNNNCNNGNAAACGNCCNNGANGGCAGCGNN

97	5573-2 5	1	2%	AACNCG GCCNNCNNGNAAACGNCCNNGANGCAGCGNN
Sequence Pattern				
AGNNNGANCC				
99	5573-3	7	16%	NACGGCANNCGGNGCAAGNNNGANCCNCCGAGCCNAN
CGANCACACGCACANNAGNCAGNNNGANCCANNAANCA				
101	5573-2 14	32%	NCAGGNNANACCCAGGNAGGAAACGNGNACGNCCGAN	
102	5573-4 8	18%	AANNNANGNGANCAANNGAGCGACGCCANNNGACNNCG	
103	5573-1 4	7%	GGNGGNGGAANNGCAAGNGNANGGGNNACGCCGNAN	
104	5573-2 4	5%	NGCGNCNGANCCNAAAACCANNNAAGCNACCANGNNNA	
105	5573-9	2	5%	CGCCGNNNCGNCCGCCACAANNAAGNACAANNNGAN
106	5573-1 1	5%	NGNCCGCGACCANNNCNGNAGCCNCNGNAANNAGN	
Clones from Pool 5578 (2NapdU)				
SE Q ID NO	Aptamer ID No.	Coun t	Pct	
10 7	5578-66	3	7%	GAAAGCNCGNACGNAGNNNGAGAGGNCNCNGCCNCNN
10 8	5578-73	4	9%	ANNAAGCNNGNGCNGNAGCNGACGCCAGGGANNCGA

[0153]

실시예 5: 2성분 독소 (A 사슬) 암타머 클론

제조합 2성분 독소 A 사슬(CdtA)를 이용하는 SELEX로 TrpdU, 2NapdU 및 PEdu 변형 뉴클레오티드를 가지는 활성 암타머를 생산하였다(표 7).

CdtA 암타머의 서열 및 공통 서열 패턴을 표 8에 나타내었다.

풀 4758(TrpdU)의 클로닝은 클론 4758-6이 그 풀에 있는 서열의 18%를 이루고 있으며, CdtA 2성분 독소에 대하여 우수한 친화력($K_d = 0.86\text{nM}$)을 나타낸다는 것을 보여주었다.

2NapdU 풀로부터의 20개의 서열들을 얻었으며, 그것들 중 대부분이 서브 나노몰 단위의 친화력을 가지고, 몇몇의 서열 패턴들은 이들 2NapdU 클론 간에 공유된다는 것을 확인하였다: GAANANnNCCGNGAnGNAANGnnANANNS (SEQ ID NO: 110), ANNRCGNnCCNGGCS (SEQ ID NO: 124), WAWNNNANNA (SEQ ID NO: 125), 및 GGANNGCAGNNNCMC (SEQ ID NO: 134) (N = PEdu; n = A, G, C 또는 PEdu; M = A 또는 C; W = A 또는 N; S = C 또는 G; R = A 또는 G).

PEdu 풀은 다섯 개의 활성 암타머들을 포함하고 있었고; 그것들은 다중 카페로 존재하고 있었으며, 그 서열들 중 세 개는 패턴 NAAAWGNNN (SEQ ID NO: 145) (N = PEdu; W = A 또는 N)을 공유하고 있었다.

클로스트리디움 디피실 2성분 독소 A 사슬을 이용한 SELEX로부터 얻은 암타머 클론의 친화력

표 7

2성분 독소 A 사슬			재조합 CdtA 단백질에 대한 친화력 (SELEX 표적)	
(CdtA_CLODI) 암타머		MOD	K _d (nM)	플라토
클론 ID	Seq-ID			
239-7-39-6	4758-6_0	TrpdU	0.86	18%
261-8-24-49	5551-49_0	2NapdU	0.31	9%
261-8-24-50	5551-50_0	2NapdU	0.09	30%
261-8-24-52	5551-52_0	2NapdU	0.14	26%
261-8-24-60	5551-60_0	2NapdU	5.79	60%
261-8-24-81	5551-81_0	2NapdU	0.54	32%
261-8-32-6	5555-6_0	PEdU	0.62	21%
261-8-32-15	5555-15_0	PEdU	1.72	18%
261-8-32-39	5555-39_0	PEdU	0.34	12%
270-8-6-1	5567-1_0	2NapdU	0.15	24%
270-8-6-2	5567-2_0	2NapdU	6.81	25%
270-8-6-10	5567-10_0	2NapdU	0.03	17%
270-8-6-13	5567-13_0	2NapdU	0.03	22%
270-8-6-18	5567-18_0	2NapdU	0.16	10%
270-8-6-34	5567-34_0	2NapdU	0.09	14%
270-8-6-46	5567-46_0	2NapdU	0.05	12%
270-8-14-49	5574-49_0	PEdU	0.16	57%
270-8-14-56	5574-56_0	PEdU	2.92	55%
270-8-31-5	5579-5_0	2NapdU	2.24	13%
270-8-31-7	5579-7_0	2NapdU	2.44	44%
270-8-31-8	5579-8_0	2NapdU	0.53	41%
270-8-31-10	5579-10_0	2NapdU	0.15	36%
270-8-31-11	5579-11_0	2NapdU	0.07	33%
270-8-31-12	5579-12_0	2NapdU	0.97	53%
270-8-31-21	5579-21_0	2NapdU	0.24	35%

[0161]

표 8은 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 A 암타머 클론이다. 주요 서열(lead sequence)은 볼드체로 된 그것들의 "암타머 ID No."를 가지고, 공통 서열은 라벨 "서열 패턴(Sequence Pattern)" 아래에 밑줄로 나타내었다. 기본 대문자 "N"은 특정 풀(TrpdU, 2NapdU 또는 PEdU)에 대하여 표시한 것으로서 변경된 뉴클레오티드를 나타낸다. 공통 서열에서 기본 소문자 "n"은 A, G, C로부터 선택된 모티프 내의 가변성 염기(variable base) 또는 특정 풀(TrpdU, 2NapdU 또는 PEdU)에 대한 변경된 뉴클레오티드를 나타낸다. IUPAC 뉴클레오티드 모호성 코드는 M = A 또는 C; R = A 또는 G; W = A 또는 N; S = C 또는 G으로 사용되었고(N은 풀-특이적(pool-specific)으로 변경된 dU를 나타냄), 공통성(consensus)을 정의하기 위하여 90%의 컷-오프(cut-off) 표현을 사용하였다.

표 8

Clones from Pool 4758 (TrpdU)				
SEQ ID NO.	Aptamer ID No.	Count	Pct	
109	4758-6	8	18%	GAAGACTTTAATTCTGACATGGTGTCCAATGGCGCGAG
Clones from Pools 5551, 5567, 5579 (2NapdU)				
SEQ ID NO.	Aptamer ID No.	Count	Pct	Sequence Pattern
				GAANANnNCCNGNGAnGNAANGnnANANNs
111	5567-30	1	1%	GAANCNGNCCNGACGNAANG AANANNc
112	5579-21	5	4%	GAANCNGNCCNGACGNAANGCCANANNCGGAGGGAN

113	5579-28	1	1%	GAANCNGNCCGNGAAGNAANGCCANANNCGCANG
114	5567-1	11	9%	GAANANGNCCGNGAAGNAANGCGANANN
115	5567-41		1%	GAANANGNCCGNGAAGNAANGGCANANNCGNCACGNGGG
116	5551-77	1	1%	CGGGNCACCGCANNCNCCGNGACGNAANGACANANNCGGN
117	5551-60	2	2%	AACCCCGCGCAANNANCCGNGAAGNAANG AANANNCCGA
118	5579-48	1	1%	ACAGAGGCANNCCGNGANGNAANGCAANANNCCGCCGN
119	5567-2	4	3%	NGCAACNANCCGNGANGNAANGCAANANNCAACANGNGC
120	5567-26	1	1%	GGACNACNCNCCGNGANGNAANGCGAAANNCCAGANGNA
121	5551-81	4	3%	NCGAANGANAACANGNAACNCCGNGANNACANGAANAGN
122	5579-7	7	6%	CNAAGCNCCGAGGCNNACNCCGNGANGCANGNNNAACC
123	5579-12	4	9%	NCGAGCAACGAGNAACNCCGNGANNACAANGANAGANGA
				Sequence Pattern
				ANNRGCN CCNGGCS WAWNNANNA
126	5579-11	10	11%	NNGCNACCCAANNAGCN CCNGGCG GNNAANNANNAGACA
127	5551-64	1	1%	CANCCAANNAGCNCCNGGCNA NGNAANNANNANGGCACN
128	5551-78	1	1%	NCGNANACCGAANNAGCNGCCNGGCNA CCNAANNANNAC
129	5551-50	2	2%	CCNGCCNCANNAGCN CCNGGCGCCNNAANNANAAAACN
130	5579-45	1	1%	GACCNCANCANNGGCN CCNGGCCG GNNAANNANNACCACC
131	5567-13	3	2%	NAGAGAAAANNGCNGCNGGCCACCCNAANNANNAGAGCA
132	5567-34	3	2%	CNCAAGGCNANNGGCN GCNGCAGA NNAANNANNAAAGNC
133	5567-10	8	6%	ANNGGCN CCNGGCCGANAANNANNACCCAGNGAGNGAA

Clones from Pools 5551, 5567, 5579 (2NapdU)

SEQ ID No.	Aptamer ID No.	Count	Pct	Sequence Pattern
				<u>GGANNGCAGGNNCMC</u>
135	5579-10	2	2%	NAGNCACGGNGAACNGGANNGCAGGNCCCCCNGCNA
136	5551-52	13	15%	GGNCAGCNGGANNGCAGGNCCCCCNGANAGGACGGNNN
137	5551-59	2	2%	GNAGNCGGANNGCAGGNCCCACCAAACACCNNNGNAGA
138	5567-46	2	2%	CNGGAGACNGNCAGAACAGCCGGANNGCAGNNCAGG
				Sequence Pattern
139				<u>GAANNGNNCCG</u>
140	5579-5	3	3%	GNNGAANNGNCCGCGCCNNNCNGCCGCGGNNCGN
141	5579-34	1	1%	NGNCAGAANNGNCCGANAGGGNNNGCNGCACNGANAN
142	5551-49	5	6%	GCCNNNNGGCGAGGNAGNNNCCAGNCNGANGAAGC
143	5579-8	5	6%	CGGAGCCCAGGNNAAGCGNNNACCCANANAGANAGC
144	5567-18	2	2%	CNCCGNANNGCGNCCNGGCAGNNAAANCNANNAGAAGCCA

Clones from Pools 5555, 5574 (PEdU)

SEQ ID No.	Aptamer ID No.	Count	Pct	Sequence Pattern
				<u>NAAAWGNNN</u>
146	5555-6	9	14%	GNGNGNCAGCGCANNANACGCGNAANNAANGNNNAGAGA
147	5555-15	8	12%	GCGNGNCNGNANAAAGNNNGCGGAGGGNNCCCGNAC
148	5574-49	13	20%	NNNCGAGAANAAANGNNNGANACANNACNNANAANGGN
149	5555-39	3	5%	AGCCGGNGNGNNGNANNAACNCNNNCGCNNCCNCCGCA
150	5574-56	11	17%	CNNGNGNAAACCGNGCGNNAGNANNGGAGANAGCNGACAN

[0164] 실시예 6: 2성분 독소 (B 사슬) 앵타머 클론

[0165] 재조합 2성분 독소 B 사슬(CdtB)를 이용한 SELEX로 2NapdU 변경 뉴클레오티드를 가지는 활성 암타머를 생산하였다(표 9). CdtB 암타머의 서열 및 공통 서열 패턴을 표 10에 나타내었다. 가장 활성 클론인 5556-51은 이들 패턴들 NNARASCS (SEQ ID NO: 151), NNNNGCENNACG (SEQ ID NO: 152), 및 AGCCNNNGRCNN (SEQ ID NO: 157) (N = 2NapdU; R = A 또는 G; S = C 또는 G) 모두를 포함하고 있었으며, 그것들 중 몇몇은 다른 서열들로 존재하고 있었다. 세 개의 추가적인 클론들은 관련없는 서열들을 가진다.

[0166] 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 B 사슬을 이용한 SELEX로부터 얻어진 암타머 클론의 친화력

표 9

2성분 독소 B 사슬			재조합 CdtB 단백질에 대한 친화력 (SELEX 표적)	
(CdtA_CLODI) 암타머			친화력 (SELEX 표적)	
클론 ID	Seq-ID	MOD	K _d (nM)	플라토
261-8-33-51	5556-51_0	2NapdU	1.68	38%
261-8-33-57	5556-57_0	2NapdU	11.60	37%
261-8-33-60	5556-60_0	2NapdU	12.30	48%
261-8-33-67	5556-67_0	2NapdU	2.16	45%
261-8-33-83	5556-83_0	2NapdU	7.62	33%

[0167]

[0168] 표 10은 클로스트리디움 디피실 2성분 독소 A 암타머 클론이다. 주요 서열(lead sequence)은 볼드체로 된 그것들의 "암타머 ID No."를 가지고, 공통 서열은 라벨 "서열 패턴(Sequence Pattern)" 아래에 밑줄로 나타내었다. 기본 대문자 "N"은 2NapdU를 나타낸다. IUPAC 뉴클레오티드 모호성 코드는 R = A 또는 G; S = C 또는 G로 사용되었고, 공통성(consensus)을 정의하기 위하여 90%의 컷-오프(cut-off) 표현을 사용하였다.

표 10

Clones from Pool 5556 (2NapdU)				
SEQ ID NO.	Aptamer ID No.	Count	Pct	Sequence Pattern
				NNARASCS
				<u>NNNGGCNNNACG</u>
153	5556-51	5	15%	AAGNNAAACCGAGACGCCGGAGCCNNNGCENNACG
154	5556-87	1	3%	GNNAACCCCGGGGGGCAAGCGCANNNGCENNACGAA
155	5556-94	1	3%	CAACGNNAANNAGAGCCNNNGCNAACAAANNACGANG
156	5556-69	1	3%	AANCAGGCCNNANAACCCNNAAACCCNNNACCAANN
				Sequence Pattern
				<u>AGCCNNNGRCNN</u>
158	5556-51	5	15%	AAGNNAAACCGAGACGCCGGAGCCNNNGCENNACG
159	5556-60	1	3%	GNNAANNAGAGCCNNNGACNNGAACAGNNACCGCANNAC
160	5556-57	4	12%	CNNGACGNACCNNNNCGACACAGAACAGAACCCNNC
161	5556-67	2	6%	GGACCGANGAANCAGCNGNNAANAGCGNNNGAGCNA
162	5556-83	2	6%	CACNNAGCAACCGACACAAGNNNGCENNACCGNNANA

[0170] 실시예 7 : 진단 시약으로서 독소 A/B 및 2성분 독소에 대한 암타머의 사용: 풀-다운 검정법

[0171] 첨가 시료(spiked samples)로부터, 그것들의 각각의 표적, 독소 A, 독소 B 또는 2성분 독소에 대한 암타머가 특별히 풀-다운 검정법에 사용되었으므로, 필요에 따라 이들 단백질의 친화적 정제가 달성되었다.

[0172] 이 검정법에서, 비오티닐화된 암타머를 MyOne 스트렙타비딘 비드에 고정화시키고, 결합시키기 위하여 그것들의 표적과 함께 1시간 동안 혼합하였다. 그 후, 비드를 세척하고, 포획된 표적을 NHS-Alexa-647로 태깅하였다. 광범위한 세척 후, 포획된 표적을 20mM NaOH로 용출하고, 중성화시킨 후, SDS-PAGE로 분석하고, cy5 채널을 사용하여 단백질을 가시화하였다.

[0173] 도 2는 하기의 풀 다운 검정 결과를 나타낸다: 독소 A 암타머는 대조군 단백질 독소 B 또는 BSA 이상의 우수한 친화력으로 독소 A(재조합 또는 천연)를 끌어내리고; 독소 B 암타머는 독소 B(재조합 또는 천연)를 끌어내리지만 독소 A는 끌어내리지 않고; 2성분 독소 A 서브유닛에 대한 암타머는 CdtA는 끌어내리지만 CdtB는 끌어내리지 않으며; 랜덤 암타머가 사용되는 경우 어떠한 단백질도 풀다운 단편에 존재하지 않는다.

[0174] 실시예 8: 진단 시약으로서 독소 A/B 및 2성분 독소에 대한 암타머의 사용: 점 블록 검정법

[0175] 예를 들어, 비오티닐화된 암타머 및 알카라인 포스파타아제(alkaline phosphatase, AP) 또는 서양고추냉이 페옥시다아제(horseradish peroxidase, HRP)와 같은 신호 증폭 효소(signal amplifying enzyme)를 사용하는 점 블록 검정법에서 독소의 검출을 위하여 암타머를 사용하였다.

[0176] 독소 검출은 독소 A 및 B의 간단한 점 블록으로 나타났다(도 3A 및 3B). 이 검정법에서, 1 μ L의 연속적으로 희석된 표적을 점으로 찍고, 니트로셀룰로오스 막 위에서 공기건조시켰다. 차단(blocking) 후, 각각의 비오티닐화된 암타머를 첨가한 후(1nM), SA-AP 컨쥬게이트(200ng/mL)을 첨가하고, NBT/BCIP 기질을 사용하여 발색시켰다. 암타머를 사용한 검출 한계는 독소 A 및 독소 B 중 하나에 대하여 1 fmole(300pg)까지이다. 동일한 농도(1nM)에서 동일한 검정법에 대하여 사용된 모노클로날 항체들은 그다지 우수하지는 않았지만, 2 fmole(600pg)의 독소 A 및 20 fmole(6ng)의 독소 B를 검출할 수 있었다.

[0177] 실시예 9: 진단 시약으로서 독소 A/B 및 2성분 독소에 대한 암타머의 사용: qPCR을 이용한 캐치 1&2 검정법

[0178] 캐치 1 - 캐치 2 검정법을 도 8에 나타내었다. 캐치 2 용출액(eluates)의 qPCR을 통하여 정량적으로 독소 A 및 B를 검출하였다. 캐치 1에서, 독소(0.001 - 10nM)와 과량의 BSA(1.5 μ M)을 포함하는 첨가 시료를 광절단가능한 비오틴-D 스페이서(biotin-D spacer)(10nM)을 포함하는 암타머로 평형화시키고, 스트렙타비딘 아가로오스 비드로 포획하였다(상대적으로 깨끗한 비드는 빛을 통과할 수 있게 한다). 자유 단백질을 제거하기 위한 세척 후, 캐치 1 샘플의 독소(표적)을 NHS-비오틴으로 태깅하고, 암타머를 스트렙타비딘 아가로오스 비드를 광절단하였고, 복합체를 MyOne 스트렙타비딘 비드(캐치 2) 상에 포획하였다. 광절단 후 광절단가능한 비오틴-D 스페이서는 더 이상 MyOne 스트렙타비딘 비드에의 결합을 매개하지 않기 때문에, 캐치 2에서 MyOne 스트렙타비딘 비드에의 결합은 독소(표적) 상의 NHS-비오틴에 의해서 매개된다. 자유 암타머를 제거하기 위한 세척 후, 표적에 결합된 암타머들을 높은 pH에서 용출하여 qPCR을 위하여 사용하였으며; 암타머들에 대한 표준 곡선을 나란히 이었다. 0.1nM보다 큰 농도에서만 독소 A 및 B에 대한 정량적 결과를 얻었다. 더 낮은 표적 농도에서는 비특이적 백그라운드를 얻었으며, pPCR 곡선은 12 사이클 이전에 플라토에 도달하였다. 이는 아마도 캐치 1 및 2 동안 자유 암타머들의 상당한 이행(carry over)과 상당히 높은(10nM) 암타머 농도 때문일 것이다.

[0179] 실시예 10: 진단 시약으로서 독소 A/B 및 2성분 독소에 대한 암타머의 사용: 암타머-표적-항체 샌드위치 검정법

[0180] 비오티닐화된 암타머 및 모노클로날 항체를 사용하여 스트렙타비딘 플레이트 샌드위치 검정법(streptavidin plate sandwich assay)에서 독소를 검출하였다(도 5a-b).

[0181] 독소 검출은 독소 A 및 B에 대하여 나타내었다. 비오티닐화된 암타머(1 pmole/웰)를 스트렙타비딘 플레이트 상에 고정화시키고, 100fMoles(30ng), 10fMoles(3ng), 1fMole(300pg) 및 단백질을 포함하지 않는 대조군에 대응하는 표적 단백질(1nM, 100pM, 10pM, 단백질을 포함하지 않음)을 첨가하였다. 플레이트를 세척하고, 독소 A 또는 B에 대한 모노클로날 항체를 첨가하여(각각 2nM) 상온에서 흔들어주면서 1시간 동안 결합시켰다. 염소-항-마우스 HRP 컨쥬게이트와 HRP 기질로서 TMB를 사용하여 복합체를 검출하였다(도 5a 및 5b).

[0182] 샌드위치 검정법은 표적 농도-의존적 신호와 낮은 백그라운드의 양호한 결과를 주었다. 네 개의 독소 A 암타머 모두 그것들의 K_d 에 상관없이 10 pM의 독소 A(1 fMole, 300pg)를 검출할 수 있었고, 독소 B와 교차반응하지 않았다. K_d 값이 더 좋았음에도 불구하고, 독소 B에 대한 암타머는 이 검정법에서 나쁜 민감도를 나타내었으며,

이는 아마도 암타머와 항체의 결합 부위가 중복되기 때문일 것이다. 독소 B 암타머들 중 하나(2937-49)는 독소 A와 교차반응하지 않았으며, 풀-다운 실험으로부터 얻은 결과와 일치하였다.

[0183] 실시예 11: 진단 시약으로서 독소 A/B 및 2성분 독소에 대한 암타머의 사용: 항체-표적-암타머 샌드위치 검정법

[0184] 비오티닐화된 암타머와 모노클로날 항체를 사용하여, 항체-암타머 샌드위치 검정법, 예를 들어 딥스틱-타입의 검정 포맷으로 독소 A의 검출을 위하여 암타머를 사용하였다(도 6).

[0185] 독소 A 및 B에 대한 모노클로날 항체를 각각 니트로셀룰로오스의 작은 조각($0.6\text{cm} \times 2.5\text{cm}$)에 점으로 찍고 공기 건조하였다. SB18T + 1% BSA를 사용하여 블록킹한 후, 상기 조각을 딥 웰 플레이트(deep well plate)에 수직으로 세워두고, 독소 A 및/또는 독소 B 또는 대조군을 포함하는 0.6mL 의 샘플을 첨가하였다. 상온에서 1시간 흔들어준 후, 조각들을 3번 세척하였다. 비오티닐화된 암타머(1nM)를 첨가하여(0.6mL) 상온에서 1시간 동안 결합시켰다. 조각들을 다시 한번 세척하고, 1nM 스트렙타비딘-알카라인 포스파타아제 컨쥬케이트 및 NBT/BCIP로 발색시켰다(1시간)(도 6).

[0186] 독소 A 암타머 4943-51은 독소 A만 또는 독소 A와 B(1000fMoles 또는 100fMoles)를 모두 포함하는 모든 샘플에서 정확하게 독소 A를 검출하였으며, 독소 B와 교차반응하지 않았다. 유사하게는, 독소 B 암타머는 독소 B를 검출할 수 있었다. 백그라운드는 심지어 샘플 안에 어떠한 단백질도 존재하지 않은 경우 및 랜덤 대조군 암타머가 사용되었을 경우에도 독소 B 스팟(spot)에서 특히 높게 나타났으며, 이는 독소 B 모노클로날 항체에 대한 스트렙타비딘-알카라인 포스파타아제 컨쥬케이트의 비특이적 결합 때문인 것으로 추측된다.

[0187] 실시예 12: 진단 시약으로서 독소 A/B 및 2성분 독소에 대한 암타머의 사용: 암타머-표적-암타머 샌드위치 검정법

[0188] 어떠한 항체도 필요없이, 한 쌍의 암타머를 사용하여 암타머-암타머 샌드위치 검정법, 예를 들어 비드-기반 검정 포맷에서의 독소의 검출을 위하여 암타머를 사용하였다(도 7).

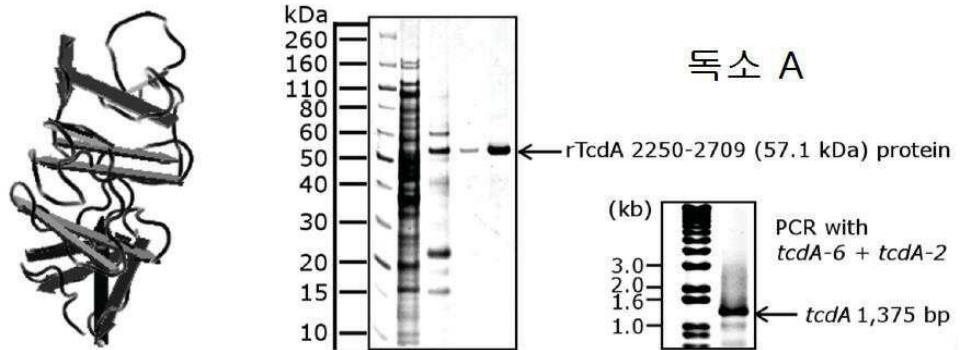
[0189] 제1의 비오티닐화된 암타머(클론 4758-6)를 MyOneTM 스트렙타비딘 비드에 부착시킴으로써 포획 비드를 제조하였다. 연속 희석으로 표적 단백질(CdtA)을 포함하는 샘플을 첨가하고, CdtA를 이들 포획 비드에 결합시켰다. 비드를 세척한 후, 제2의 방사성 표지된 CdtA 암타머 클론을 평형 결합을 위하여 첨가하였다. 그 후, 혼합물을 분리를 위하여 포획 비드 자체를 사용하여 MAHVN 플레이트($0.22\mu\text{m}$)를 통하여 여과하였다. 이 방법은 스트렙타비딘-암타머 4758-6-CdtA 복합체에 대하여 샌드위치-타입 포맷으로 결합된 표지된 암타머들만을 검출할 것이다.

[0190] CdtA 암타머 쌍에 대한 포획 비드 검정법의 결과를 도 7에 나타내었다. 적합한 쌍의 암타머는 표적 농도-의존적 신호를 생성하였다. (동일한 에피토프에 결합하는) 동일한 암타머 또는 (서로 다른 표적에 결합하는) 대조군 암타머가 사용된다면, 어떠한 신호도 생성되지 않는다.

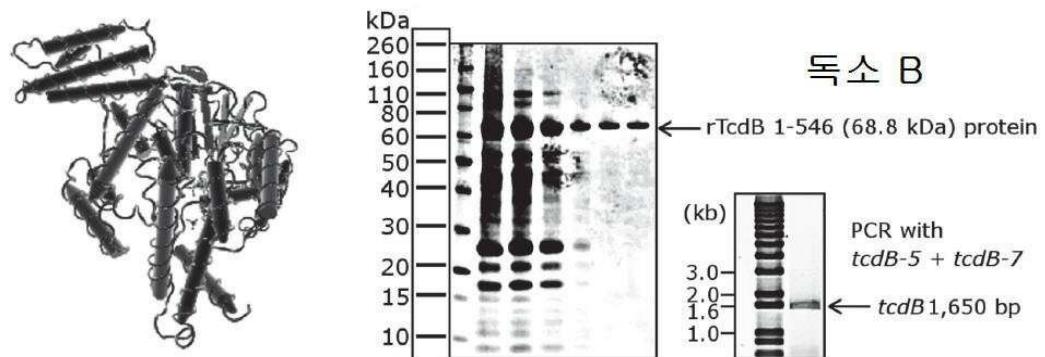
[0191] 이 검정법은 표적 상에 있는 다른 에피토프들에 결합하는 암타머, 즉 동일한 에피토프와 경쟁하는 것이 아니라, 별개의 부위에 결합하는 각각의 암타머를 선별하는데 사용될 수 있다.

도면

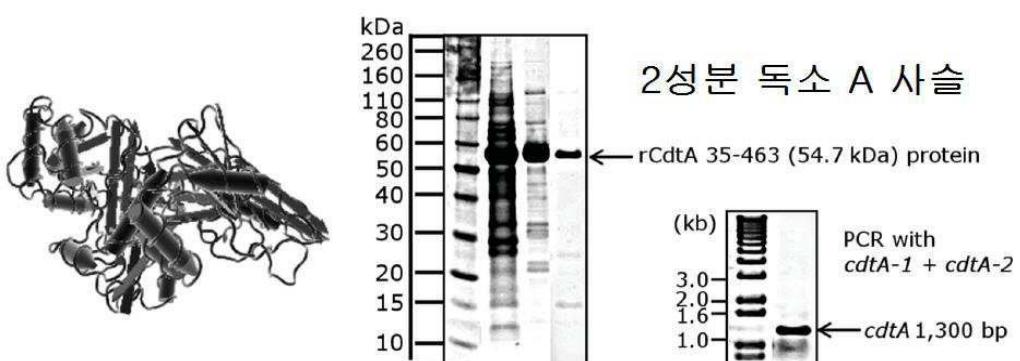
도면 1a



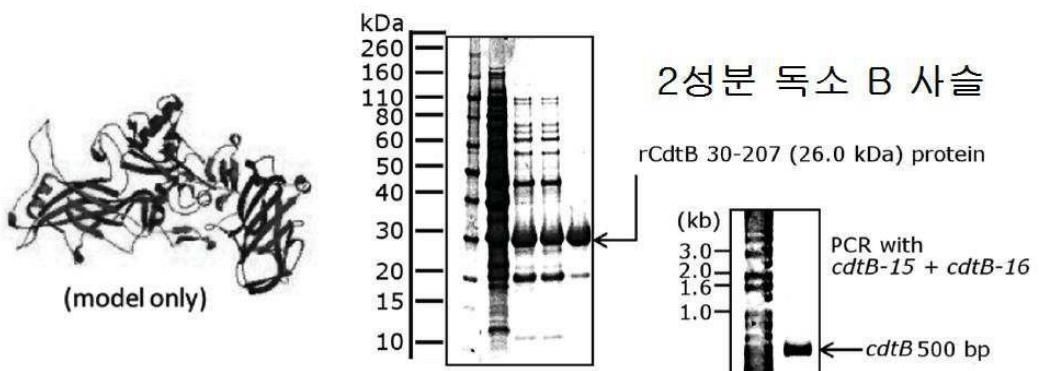
도면 1b



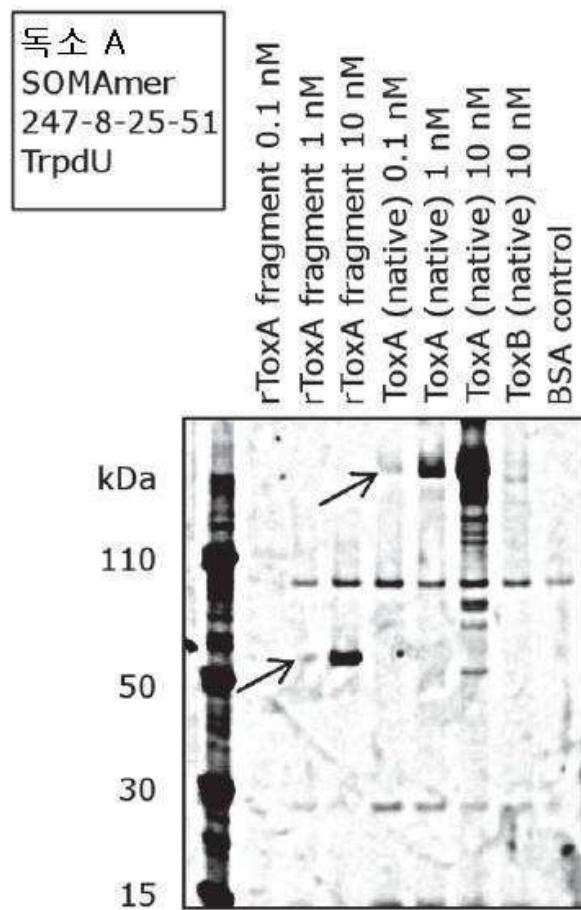
도면 1c



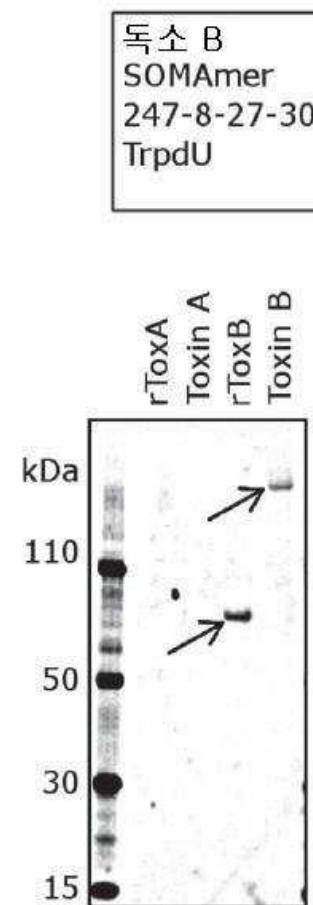
도면1d



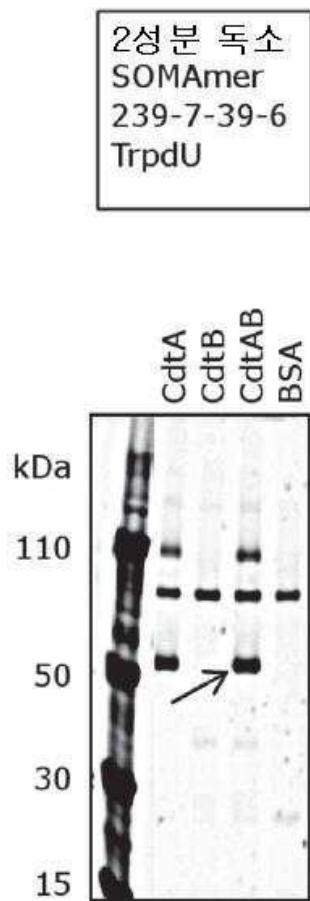
도면2a



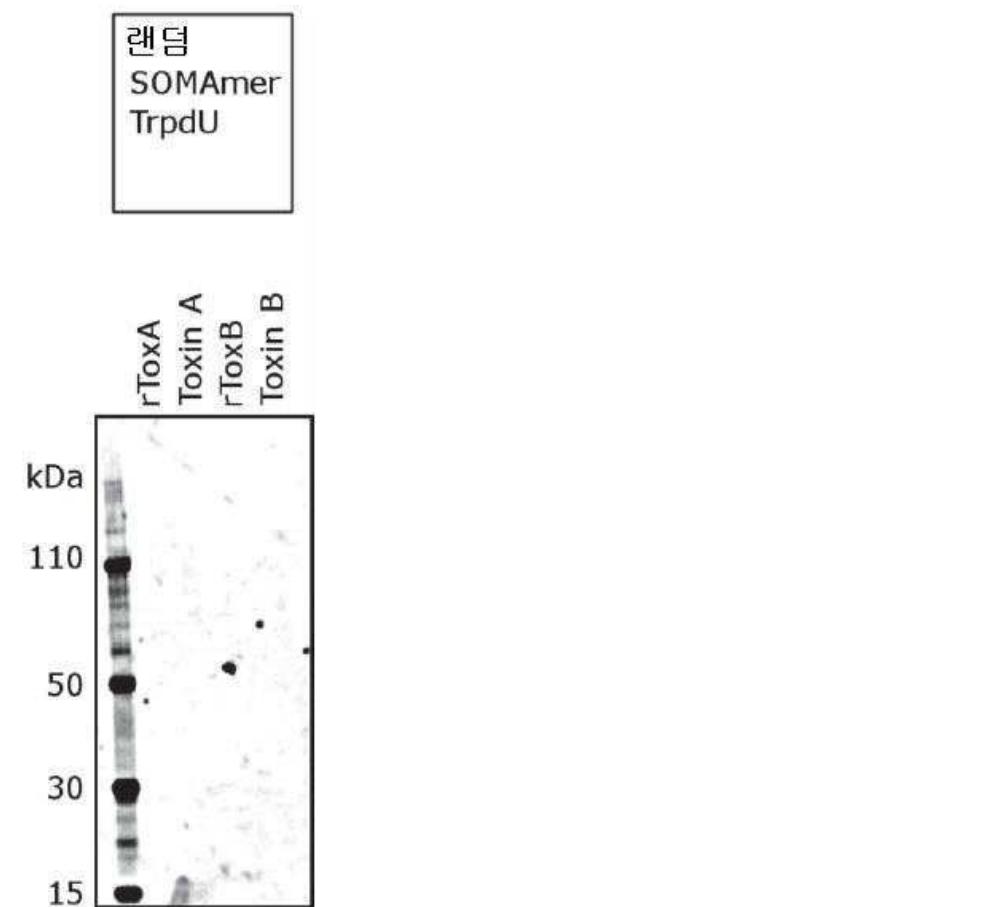
도면2b



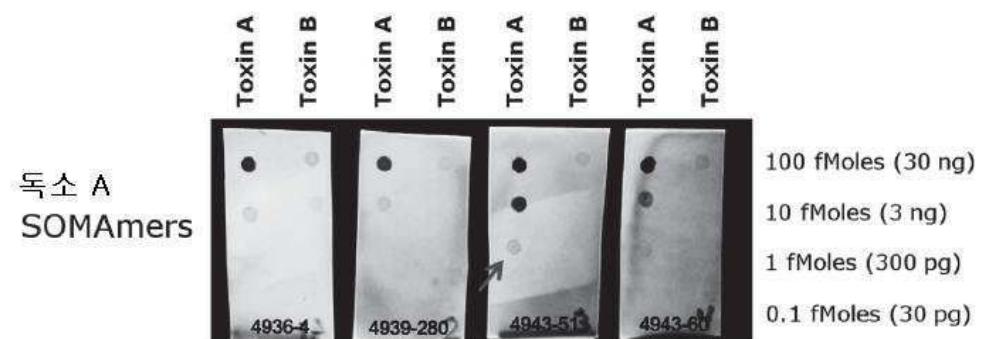
도면2c



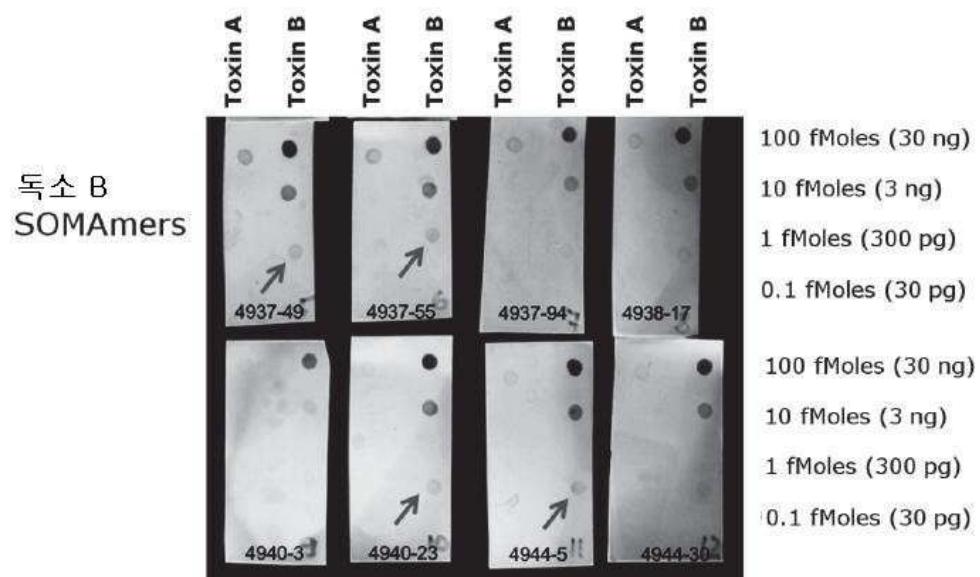
도면2d



도면3a

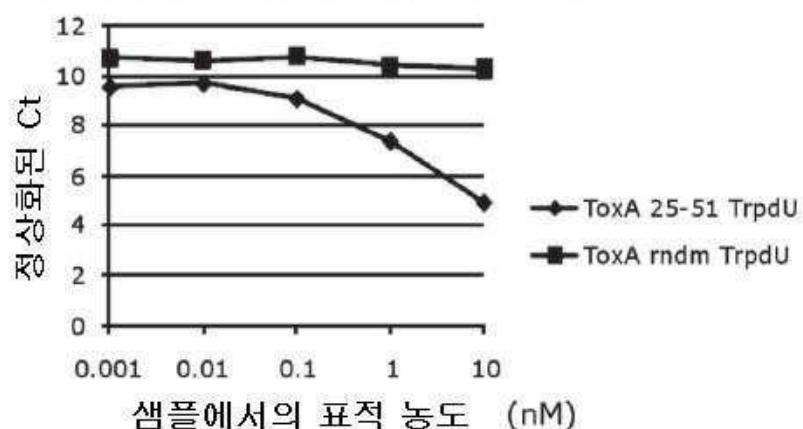


도면3b

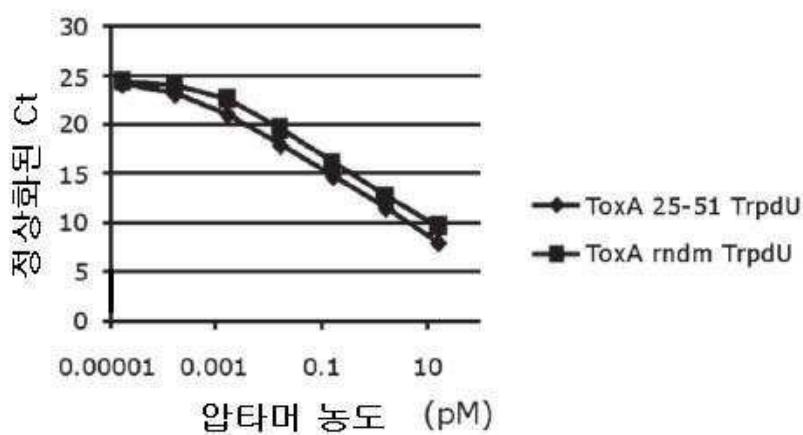


도면4a

독소 A 검출: 캐치 2 용출액의 qPCR

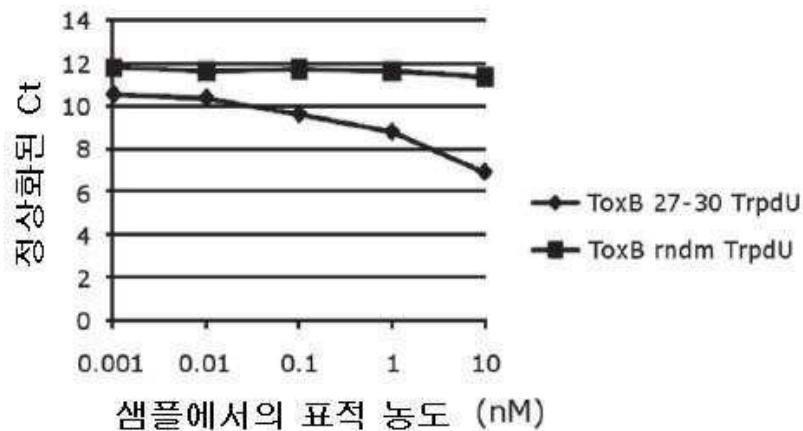


qPCR 표준 곡선

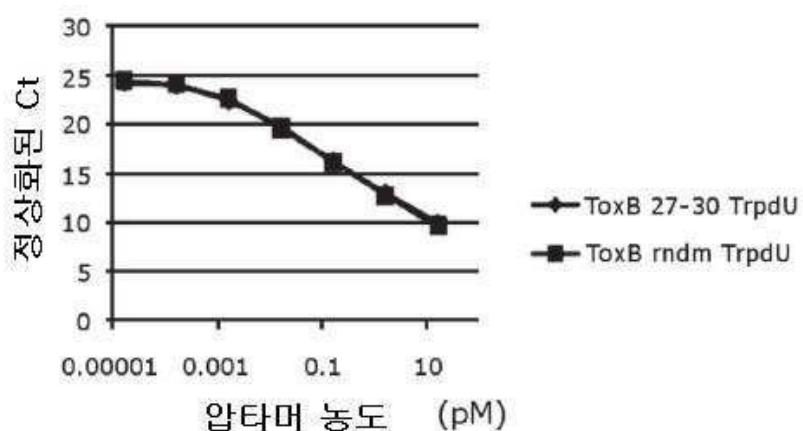


도면4b

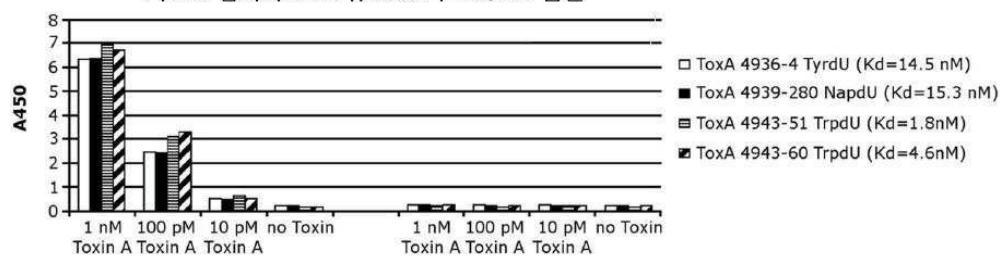
독소 B 검출: 캐치 2 용출액의 qPCR



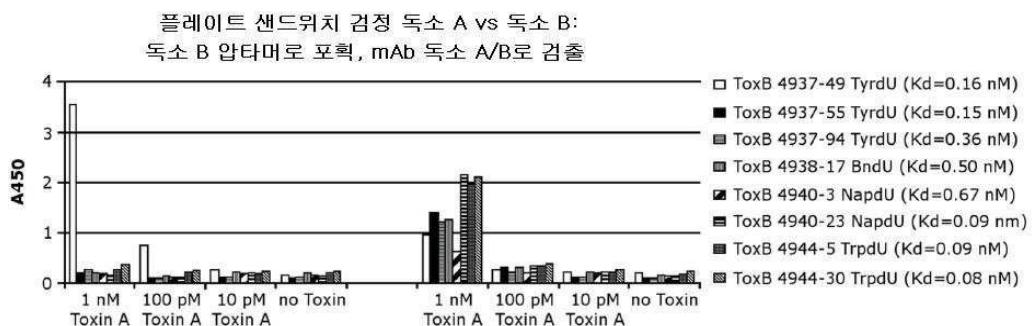
qPCR 표준 곡선



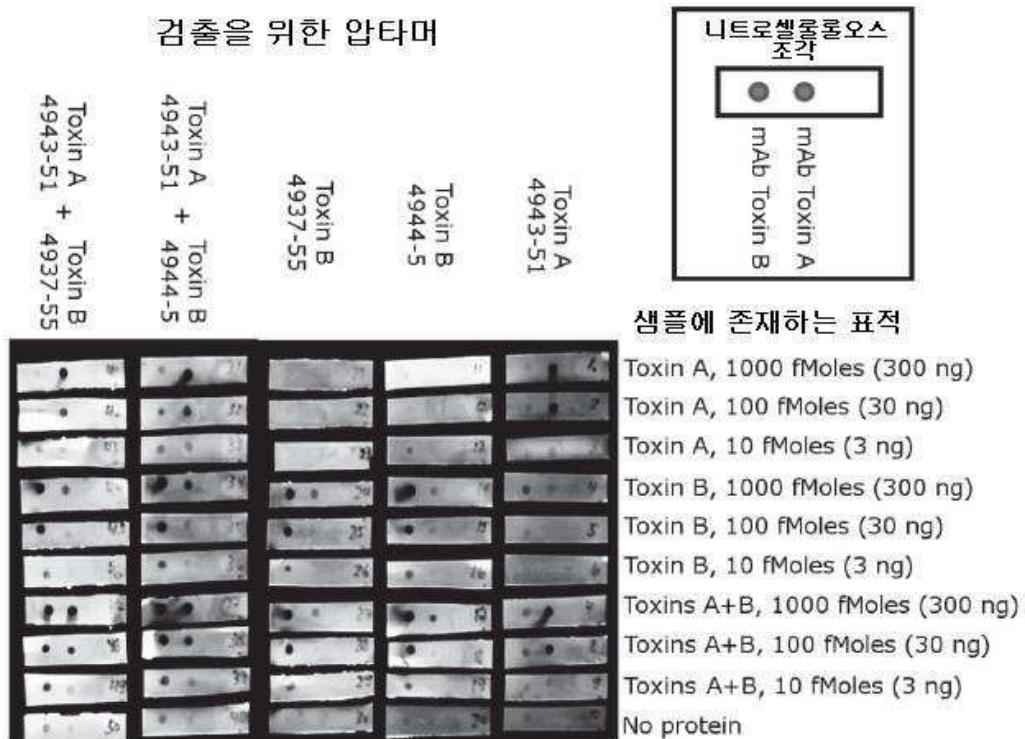
도면5a

플레이트 샌드위치 검정 독소 A vs 독소 B:
독소 A 압타머로 포획, mAb 독소 A/B로 검출

도면5b



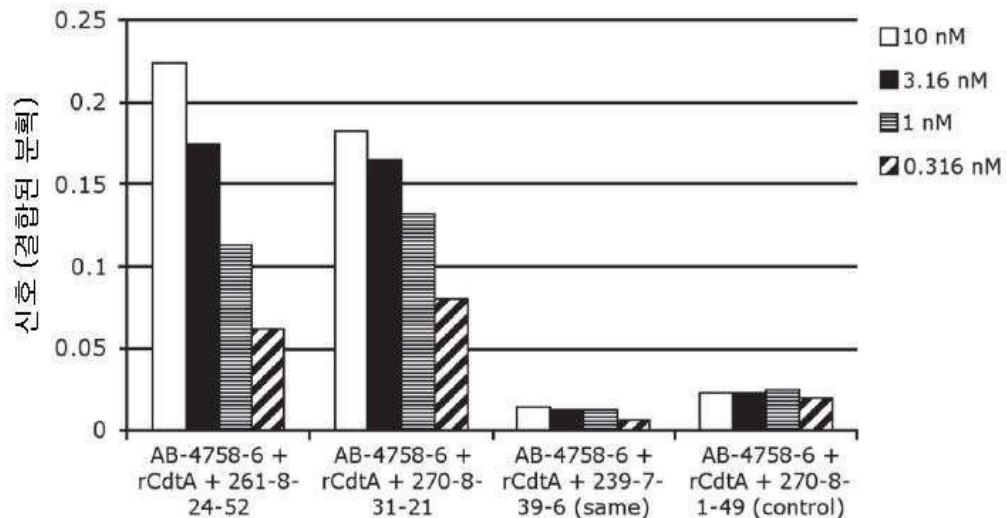
도면6



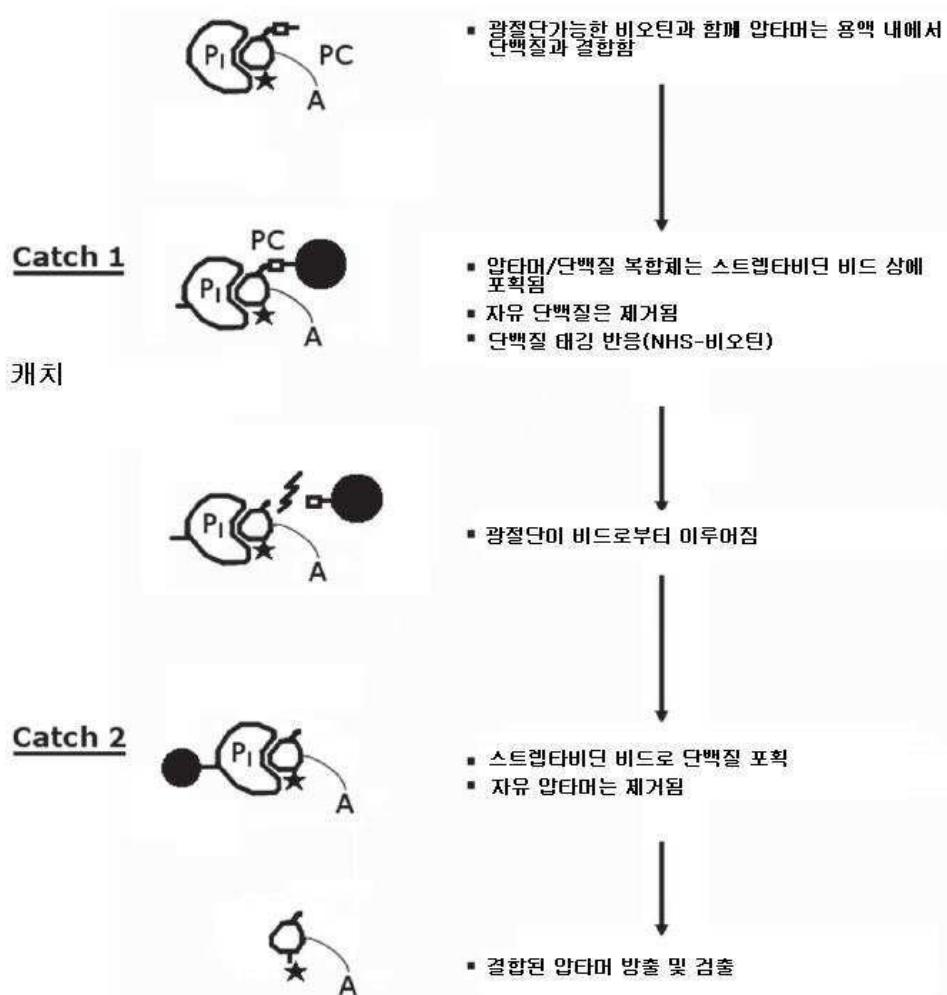
랜덤 대조군 TyrdU, TrpdU



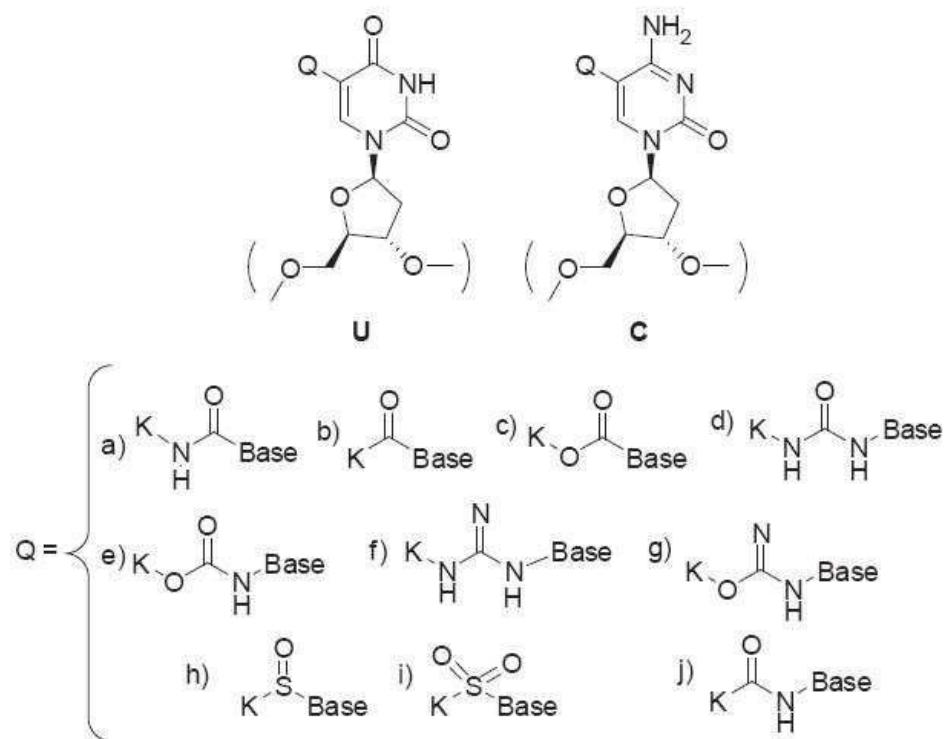
도면7



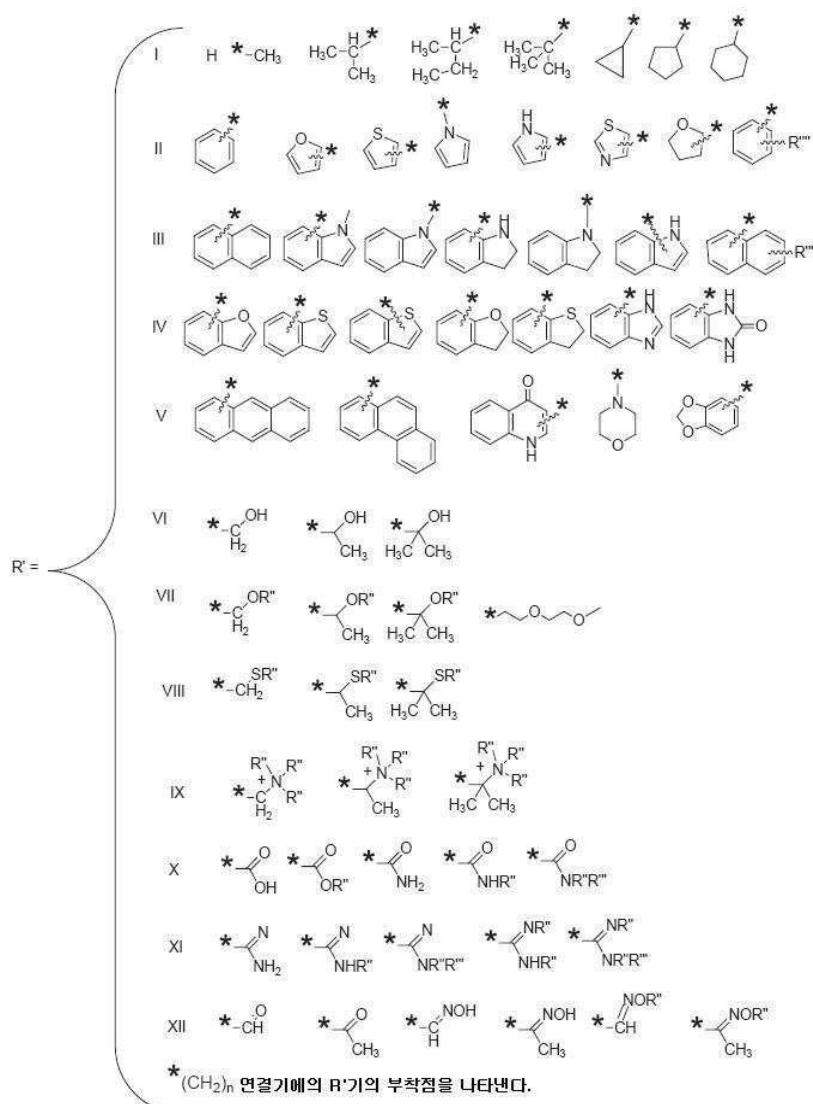
도면8



도면9a



도면9b



여기에서,

R'은 분자된 또는 선형의 저급 알킬(C1-C20); 하이드록실(OH), 할로겐(F, Cl, Br, I); 니트릴(CN); 브론산(BO2H2);

카르복실산(COOH); 카르복실산 에스테르(COOR'); 1차 아미드(CONH2); 2차 아미드(CONHR'); 3차 아미드(CONR''R''');

술폰아미드(SO2NH2); N-알킬술폰아미드(SONHR'')로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

여기에서,

R', R''는 분자된 또는 선형의 저급 알킬(C1-C20); 페닐(C6H5); R''' 치환된 페닐 고리(R''''C6H4);

여기에서 R'''는 삼기애 정의하였고; 카르복실산(COOH); 카르복실산 에스테르(COOR'''); 여기에서 R'''는 분자된

또는 선형의 저급 알킬(C1-C20); 및 시클로알킬; 여기에서 R'=R'''=(CH2) n ; 여기에서 n=2-100이고, R'''는

군으로부터 독립적으로 선택된다.

서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SomaLogic, Inc.

<120> APTAMERS FOR C. DIFFICILE DIAGNOSTICS

<130> 0057.41

<150> 61/451,227

<151> 2011-03-10

<160> 170

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU

<400> 1

aannccnanc cnanncaanca cnncnnnaga nnanncnang

40

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<400> 2

gncanngngc cccacgnan nancngacnn cgacnaacga

40

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<400> 3

acnngnagna gccnnaann gggngcgnc ggcannangg

40

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<400> 4

cncgnnaggg nnnanccaan accgnggngc cnnaacnaaa

40

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n = 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n = 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> n = A, G, C, or 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(10)

<223> n = 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> n = A, G, C, or 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n = A, G, C, or 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU
<400> 5
nananncnncnnn cnncnnn 16
<210> 6
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxyamide-dU
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU
<400> 6
agcannaaan nanagacnnn cgncancgnc ccccnncggn 40
<210> 7
<211> 40
<212> DNA
<
213> Artificial Sequence
<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxyamide-dU
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU
<400> 7
ancncncaca nnanagacnn ncnnccanggn ccnccngaga 40
<210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxyamide-dU
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(32)
<223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU
<400> 8

ngccnaaac nanaaccnnn ccacgngnac nn

32

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(39)

<223> 5-tryptaminocarboxamide-dU

<400> 9

gnanancaac ncgncanggn agcgnaannc nacgnaga

39

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<400> 10

ccngacgggc gaggnccaa cnacnnccg ncacnanngc

40

<210> 11

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(10)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<400> 11

naaagnaggn

10

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 12

cgcangngnn cnganacacn ggccnaaagn aggnncngnag 40

<210> 13

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 13

ccgnncnaan accaanggan aaagnaggna ggagcncgca 40

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 14

naccaganag nnanaanacg cnngcnaaag naggncnaa 40

<210> 15

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220
 ><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n = A or G
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n = A or C
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n = g or 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <400> 15

gnnnncnnnc nga 13

<210> 16
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <400> 16

cnaaangaag nngncagnnc gacgccagng cgnaccgn 38

<210> 17
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 17
 ngcgnaccg cngnngncag ncngagagan cggcnaagaa 40

<210> 18
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 18
 cnagcngcan acccacgnn gncagncnga gcgccacn 39

<210> 19
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <400> 19

ngccngccca ccngnngnca gncngagagc nanccaaaca 40
 <210> 20
 <211> 39
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(39)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 20

cangccngca naccacacgn ngnnagncng agggnnagg 39

<210> 21

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 21

gggnaccnacc cgcagngnna ncannncngac cgcgacnnnn 40

<210> 22

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(39)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400>

> 22

cngnnancgg ncnngacaccn accnaccggaa gnaaganc 39

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 23

cgggnncngca cagancgca

19

<210> 24

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 24

cgagcgggnc gngacaganc gcagagcgaa ggcnnacnac

40

<210> 25

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 25

ncngangggc caacaaangn ccgggnncng acagancgca

40

<210> 26

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-phenethyl-1-carboxyamide

<400> 26

gcngaggccg ngcncannaa nngaacnnag aananccna	40
<210> 27	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(40)	
<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide	
<400> 27	
accgcnaaag naggncacgn ncnaanaccc ngggaggngn	40
<210> 28	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(1)	
<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (10)..(11)	
<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (12)..(12)	
<223> n = A, G, C, or 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (13)..(13)	
<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (17)..(17)	
<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (19)..(19)	

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide	
<400> 28	
naccgaacgn nnncagncng a	21
<210> 29	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(40)	
<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide	
<400> 29	
gcngccnacc gaacgnngnc agncngagcg ancgaacnng	40
<210> 30	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(40)	
<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide	
<400> 30	
agccacgnac anaccgaacg nnancagnnc gacgcnngna	40
<210> 31	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(40)	
<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide	
<400> 31	
ccgngcanac ccccnngnng ncagncngac ggccagacac	40

<210> 32
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n = C or 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> n = C or G
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n = A or 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <400> 32
 nnnnnngaan 10
 <210> 33
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <400> 33
 nannncnna aggcnngng aaaaccgcnn nncggnnngcg 40
 <210> 34
 <211> 40

<212> DNA

<

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU

<400> 34

nggaccacna nccncccc caaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa 40

<210> 35

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU

<400> 35

nggancacgn annccacnn accnncnnga aanagcannn 40

<210> 36

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU

<400> 36

acnngngaa anncacnnnc ngccagcanc nannccgcnn 40

<210> 37

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(43)
 <223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <400> 37

nngcacgaa gnanngacnn ngaanngcng aaacancnn ncn 43

<210> 38
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(35)
 <223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <400> 38

nggacaccna nnacagnncnn cgncaaannng cannn 35

<210> 39
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <400> 39

gngcngccca ncncncncn cnngaaanc cgaanncc 38

<210> 40
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU

<400> 40	
nccanccac cgccggcca cagnancang nnngcngaan	40
<210> 41	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(40)	
<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<400> 41	
nccnancnc ncnncngaa nccgaanngc cnacngccnn	40
<210> 42	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(41)	
<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<400> 42	
ncacaaacna nccgnncnn ggnngaanncn caannncngg n	41
<210> 43	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(40)	
<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<400> 43	
nacnancacg cnnnngngaa anngcgaann cccggaggnn	40
<210> 44	

<211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <400> 44

aggcggnnc ncananccg caanngaang cacgcnncc 40

<210> 45
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <400> 45

gngaccaacn angnnancnn cgngaancg aanngccgn 39

<210> 46
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <220><221> misc_feature

<222> (1)..(39)
 <223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <400> 46

cacacnannc ccnaccanga nnggngaaan agcannncn 39

<210> 47
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n = C or 5-tyrosylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> n = A or 5-tyrosylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU

<400> 47

ngaann

6

<210> 48

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(36)

<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU

<400> 48

cnnacngaan acnngagcaa canccgc an ngccga

36

<210> 49

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU

<400> 49

gngcngccca ncncncncn cn nangaanc cgaanncc

38

<210> 50

<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(40)	
<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<400> 50	
nccnancnc ncnncngaa nccgaanngc cnacngccnn	40
<210> 51	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(39)	
<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<400> 51	
gngaccaacn angnnancnn cgngaancg aanngccgn	39
<210> 52	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(39)	
<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<400> 52	
aacccnngnan nccacacccnn gccgaaanng annnccnngn	39
<210> 53	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(39)

<223> n = 5-tyrosylcarboxyamide-dU

<400> 53

accangnann acccnccnn gccgaaanca gannncngg

39

<210> 54

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-tyrosylcarboxyamide-dU

<400> 54

nacnancacg cnnnnggnga anngcgaann cccggagggn

40

<210> 55

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(36)

<223> n = 5-tyrosylcarboxyamide-dU

<400> 55

ncnanncccc gagncnngan anccacgann gaannnn

36

<210> 56

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(43)

<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<400> 56	
nnngcacgaa gnanngacnn ngaanngcng aaacancnn ncn	43
<210> 57	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(41)	
<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<400> 57	
ncacaaacna nccgnccnn ggngaanncn caannncngg n	41
<210> 58	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(40)	
<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<400> 58	
ncnaaccggn ncgcanncac angaaannag gaggacancg	40
<210> 59	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(40)	
<223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU	
<400> 59	
gagcnaanng aagcnacagg acncnnggca cgacgggnna	40

<210> 60
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <400> 60

nggancacgn annccacnn accnnccnga aanagcannn 40

<210> 61
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <400> 61

ggncncancg acaaannngg aangngcgag cacnanncgn 40

<210> 62
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-tyrosylcarboxamide-dU
 <400> 62

ggcncagna ncngcagagc cagnaggaac nagacggngn 40

<210> 63
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-benzylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-benzylcarboxamide-dU

<400> 63

nnggcgcgn nngcgnang acnccnnnn cnnangcng

40

<210> 64

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-benzylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(39)

<223> n = 5-benzylcarboxamide-dU

<400> 64

agngcnagcg acnccgcngn acnacnnncnc ccnacnagn

39

<210> 65

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Modifications are 5-benzylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-benzylcarboxamide-dU

<400> 65

nanaaaaganc nngccnnngn aannccncan gacanaaaana

40

<210> 66

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n = G or 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n = C or G

<220

><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> n = 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n = A or G

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> n = A or 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<400> 66

ngannggn

10

<210> 67

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<400> 67

nccnnngcga ancgganng gannacggnn gggcaanagn

40

<210> 68

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(39)

<223> n = 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<400> 68

aggcncaang ggnancgan nggaaagcag nnaancgan 39

<210> 69

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Modifications are 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<400> 69

ggcgcncagnn ggnngganng ggagnngaa nnaggnagca 40

<210> 70

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<400> 70

ngggncncaa gnnggnngc ccannggan nggaagnccn 40

<210> 71

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<400> 71

cccnccgeng annngcaann agcacggcng ncggngacn 40

<210> 72

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<400> 72

nccancggga ccacnaacgn nagcnccagg cgggacngnc 40

<210> 73

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(39)

<223> n = 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<400> 73

nancagacccn ccancgcgncc acnnangagn ngaacacgna 39

<210> 74

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-naphthylmethylcarboxamide-dU

<400> 74

nannngnccc annccacnn aangcnagca cacgnnaaca 40

<210> 75

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n = 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n = A, G, C, or 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> n = C or 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(7)

<223> n = A, G, C, or 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n = 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> n = 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n = A, G, C, or 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n = A or G

<220><221>

 misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n = A or 5-nrypnaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n = 5-nrypnaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n = A or C

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> n = A or C

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> n = C or G

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> n = C or 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<

223> n = 5-tryptaminocarboxamide-dU

<400> 75

nncnnnnncn nnaannnnan nnn 23

<210> 76

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-tryptaminocarboxamide-dU

<400> 76

cangncncaa ncnnnaagan aacgnngacc gcgagnaccg 40

<210> 77

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-tryptaminocarboxamide-dU

<400> 77

nncnacaga cacangnccc cncncnnaaa ganaacgnng 40

<210> 78

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<400> 78

ancaccccnnc nnnaaganaa cgnncggac cgcgcganaa 40

<210> 79

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<400> 79

ncngcnangn cnnaaganc aaccnaagag angcangana 40

<210> 80

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(41)

<223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<400> 80

gnnggagcgn ngngcnca ccnnacngga ncnnngaaccn c 41

<210> 81

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<400> 81

gnccgancnnc aaannangna cgganngacn aacanggnac 40

<210> 82

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(41)

<223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<400> 82

nggnnacnac nncannncang gaccananaa cncnagnnna a 41

<210> 83

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n = A, G, C, or 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> n = A, G, C, or 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<400> 83

cnngnaneng gaaan

15

<210> 84

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<400> 84

acnnnnncgca cccggccnna ngccnngcan cnggaaanggg

40

<210> 85

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<400> 85

nnnnccgaaag ccgcnnnanc gcccacncgg ancnggaaan

40

<210> 86

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-tryptaminocarboxamide-dU

<400> 86

ngncgagnaa acggcgaccg nnnccccngn agnaacnaca 40

<210> 87

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(39)

<223> n = 5-tryptaminocarboxamide-dU

<400> 87

ngnnncaacn angaancagg cnaccgngca accaangna 39

<210> 88

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-tryptaminocarboxamide-dU

<400> 88

agngnaanag naaccnnag acnangccn nggnancgg 40

<210> 89

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU
 <400> 89
 ngcggcngaa gaagcangca agncancggc ccgnnggnan
 <210> 90
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n = A, G, C, or 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n = A, G, C, or 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(7)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(18)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n = A, G, C, or 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(29)
 <223> n = A, G, C, or 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (31)..(31)

<223> n = A, G, C, or 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (33)..(34)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> n = A, G, C, or 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 90

ancnnnnaag ngaacnnna nnnnnnnnng ngnnnana 38

<210> 91

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 91

ccagcannna agngaacnnn aaggaaggga ggagnncana 40

<210> 92

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 92

agaccgnnna agngaacnnn caacgggang cgngnnaana 40

<210> 93

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 93

agnggcgnna angcannnaa cgagcacnnga ggcgnnaana 40

<210> 94

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 94

cnnnnnnnacc gcngcangac nnnagcggca gncgngng 40

<210> 95

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(34)

<223> n = 5-phenethyl-1-carboxyamide

<400> 95

gccnnncnng nnaaacgncc nnganggcag cgnn 34

<210> 96

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide

<400> 96

gaacgngccn nncnngnnaa acgnccnnga nggcagcgnn

40

<210> 97

<211> 40

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide

<400> 97

aacncggccn nncnngnnaa acgnccnnga nggcagcgnn

40

<210> 98

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(11)

<223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide

<400> 98

agnnngancc c

11

<210> 99

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide

<400> 99

nacggcann ncggcggcaag nnnganccn ccgagccnan 40

<210> 100

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide

<

400> 100

cgancacanc gcacannagn cagnnnganc ccannaanca 40

<210> 101

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide

<400> 101

ncaggnana cccagngnag gaaaacgngn acgnncgan 40

<210> 102

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide

<400> 102

aannnangng ancaanngag cagaccgcca nnngacnnnc 40

<210> 103
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide
 <400> 103

ggngnggaa anngcaagn gnangnggn nacgccgnan 40

<210> 104
 <211> 40
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide
 <400> 104

ngcgnngan ccgnaaaacc anncaagcn accangnnna 40

<210> 105
 <211> 39
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide
 <400> 105

cgccgnnc gnccggccac aannnaagna caannggan 39

<210> 106
 <211> 40
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide

<400> 106

ngncggcga ccannncng nanagccncn ngnaannagn 40

<210> 107

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<400> 107

gaaagcnncg nacgnagnng ngagaggncn cngccncnn 40

<210> 108

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<400> 108

annaagcnng ngcnggnag cngacagcca ggganncnnga 40

<210> 109

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-tryptaminocarboxamide-dU

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-tryptaminocarboxyamide-dU

<400> 109

gaagacnnna annengacan ggngnccaan ggcgcgag 40

<210> 110

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n = A, G, C, or 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n = A, G, C, or 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> n = A, G, C, or 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (27)..(28)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n = C or G
 <400> 110

gaanannncc gngangnaan gnnanannn 29

<210> 111
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(28)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <400> 111

gaancngncc gngacgnaan gaanannc 28

<210> 112
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <400> 112

gaancngncc gngacgnaan gccananncg gaggggan 38

<210> 113
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(34)
<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
<400> 113

gaancngncc gngaagnaan gccananncg cang 34
<210> 114
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(29)
<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 114
gaanangncc gngaagnaan geganannc 29
<210> 115
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
<400> 115
gaanangncc gngaagnaan ggcannncg nccacgnggg 40
<210> 116
<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 116

cggnncacgg cancnccgn gacgnaanga canannccgn 40

<210> 117

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 117

aaccccgccgg caannancgg ngaagnaang aanannccga 40

<210> 118

<211>

> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 118

acagaggcan ncncgngan gnaangcaan annccgcccgn 40

<210> 119

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 119
 ngcaacnanc cngangnaa ngcaananng caacangngc 40

<210> 120
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <400> 120

ggacnacnacnccngangna angcgaaann cccagangna 40

<210> 121
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 121
 ncgaangana acangnaacn ccngannac ancgaanagn 40

<210> 122
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 122

cnaagcnccg aggcnacnc cgngancgca nggnnaacc 40

<210> 123

<211

> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 123

ncgagcaacg agnaacnccg ngannacaan cganaganga 40

<210> 124

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> n = A or G

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n = A, G, C, or 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n = C or G

<400> 124

annngcnncc nggcn

15

<210

> 125

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n = A or 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n = A or 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 125

nannnanna

9

<210> 126

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 126

nngcnaccca annagcncn ggccgggnnaa nnannagaca

40

<210> 127
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <400> 127
 canccaanna gcnccnggc gangnaanna nnanggcacn 40
 <210> 128
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <400> 128
 ncgnanaccg aannagcngc cnggcgaccn aannannaca 40
 <210> 129
 <211>
 > 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide
 <400> 129
 ccngccncan nagcnccngg cgcccnnnaan nannaaca 40
 <210> 130
 <211> 40
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 130

gaccncanca nnggcncng gccgggnnaan nannaccacc 40

<210> 131

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 131

nagagaaaann ggcngcnggg ccaccnnaan nannagagca 40

<210> 132

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 132

cncaaggcna nnggcngcng gcagannaan nannaagnc 40

<210> 133

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<400> 133

anngcncn gccggan aa nnanaccc agngagngaa 40

<210> 134

<211>

> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n = A or C

<400> 134

gganngcagg nnncnc 15

<210> 135

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(39)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<400> 135

nagnacgggn gaacnggann gcaggnnccc cccnggcna 39

<210> 136

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 136

ggncagcngg anngcagggn ccccccngan aggacggnnn

40

<210> 137

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 137

gnagnccgan ngcaggnnc caccaaacac cnnggnaga

40

<210> 138

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 138

cnggagacng gncagaacag ccggganngc aggnncacgg

40

<210> 139

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(11)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 139

gaannnncc g

11

<210> 140

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 140

gnngaanngn nccggcccn nncngncgc gggngcgn

40

<210> 141

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 141

ngncagaann gnnccganag ggnngcngcc acnganan

38

<210> 142

<211

> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 142

gccnnnnngc gagngagnn nncccagnn gangaagcnn	40
<210> 143	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(40)	
<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide	
<400> 143	
cgaggccgaa aggnnaagcg gnncaccann anacganaacg	40
<210> 144	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(40)	
<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide	
<400> 144	
cnccgnanng cgnccngggc agnnaancna nnagaagccaa	40
<210> 145	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(1)	
<223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (5)..(5)	
<223> n = A or 5-phenethyl-1-carboxamide	
<220><221> misc_feature	

<222> (7)..(9)

<223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide

<400> 145

naaangnnn

9

<210> 146

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide

<400> 146

gngngncagc gcannanacg cgnaannaaa ngnnnagaga

40

<210> 147

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide

<400> 147

gcgngncngn annaaaagnn ngcggagggg nncccggnac

40

<210> 148

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide

<400> 148

nnncgagaan aaangnnnga nacannacnn anaananggn	40
<210> 149	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(40)	
<223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide	
<400> 149	
agccggngng ngnannaacn cnncggcnn nccnccgca	40
<210> 150	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-phenethyl-1-carboxamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(40)	
<223> n = 5-phenethyl-1-carboxamide	
<400> 150	
cnngngnaaa ccngcgnna gnannggaga nagcngacan	40
<210> 151	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(2)	
<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide	
<220><221> misc_feature	
<222> (4)..(4)	
<223> n = A or G	
<220><221> misc_feature	

<222> (6)..(6)

<223> n = C or G

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n = C or G

<400> 151

nnanancn

8

<210> 152

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 152

nnngcnnna cg

12

<210> 153

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 153

aagnnaaacc gagacgcggc cggaagccnn nggcnnnacg

40

<210> 154

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 154

gnnaaaccggggggcca agcgcanng gcnnnacgaa 40

<210> 155

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 155

caacgnnaan nagagccnnn gnccnaacaa annacgcang 40

<210> 156

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<400> 156

aancggagcc cnmnaaaccn nnaaaccnn nanaccaann 40

<210> 157

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(7)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxyamide

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n = A or G

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<400> 157

agccnnngnc nn

12

<210> 158

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<400> 158

aagnnaaacc gagacgcggc cggaaaggccnn nggcnnnacg

40

<210> 159

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<400> 159

gnnaannaga gccnnngacn ngaacagggn cacgcannac

40

<210> 160

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<400> 160

cnngacngna ccnnnnncgca cacagaacag caagaccnn

40

<210> 161

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<400> 161

ggaccganga ancнагcnng nnaanагcgn ngагcnanc

40

<210> 162

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modifications are 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> n = 5-(2-naphthylmethyl)carboxamide

<400> 162

cacннагcaa ccgacacaag nngnnccgnn anccgnana

40

<210> 163

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for tcdA

<400> 163

gcgcaagctt cttcaaaatg gatataattac tattgaaag

39

<210> 164

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> primer for tcdA
<400> 164
gccccggc cccatataccc aggggcttt ac 32
<210> 165
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer for tcdB
<400> 165
gcgcggcatt atgagtttag ttaatagaaa acagtttag 38
<210> 166
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer for tcdB
<400> 166
gccccggc cccatttcacc aagagaacct tc 32
<210> 167
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer for cdtA
<400> 167
gcgcggcatt caagacttac aaagctatag tg 32
<210> 168
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer for cdtA
<400> 168
gccccggc caggatcaa tggatcatca ac 32
<210> 169

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for cdtB

<400> 169

gcgcaagctt caaactagta caagtaatc

29

<210> 170

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for cdtB

<400> 170

gcgcgagctc ggtcaaagaa attgttattt ggg

33