

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0126760 (43) 공개일자 2010년12월02일
<p>(51) Int. Cl. <i>C07K 16/12</i> (2006.01) <i>A61K 39/40</i> (2006.01) <i>C12N 15/13</i> (2006.01) <i>G01N 33/554</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2010-7021314</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년02월25일 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2010년09월24일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2009/035050</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2009/108652 국제공개일자 2009년09월03일</p> <p>(30) 우선권주장 61/032,270 2008년02월28일 미국(US)</p>	<p>(71) 출원인 쓰리엠 이노베이티브 프로퍼티즈 캄파니 미국 미네소타주 55133-3427 세인트 폴 피.오. 박 스 33427 쓰리엠 센터</p> <p>(72) 발명자 라자고팔 라지 미국 55133-3427 미네소타주 세인트 폴 포스트 오 피스 박스 33427 쓰리엠 센터</p> <p>웨이 아이-평 미국 55125 미네소타주 우드베리 윌링포드 씨클 2074</p> <p>(74) 대리인 김성기, 강승욱</p>

전체 청구항 수 : 총 60 항

(54) 클로스트리듐 디피실레 포자에 대한 항체 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 클로스트리듐 디피실레(*Clostridium difficile*) 박테리아의 내생포자에 결합되는 항체, 그러한 항체의 제조 방법, 및 씨. 디피실레 내생포자의 검출 방법을 포함하는 그러한 항체의 사용 방법을 제공한다.

특허청구의 범위

청구항 1

클로스트리듐 디피실레(*Clostridium difficile*) 포자에 결합되는 단리된 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 포자가 미발아(ungermiated) 포자인 단리된 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 포자가 발아(germinated) 포자인 단리된 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 클로스트리듐 디피실레 영양 세포(vegetative cell)에 결합되지 않는 단리된 항체.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 씨. 디피실레 독소에 결합되지 않는 단리된 항체.

청구항 6

서열 번호 1을 갖는 클로스트리듐 디피실레 균주(strain) 630의 가상 단백질 CD1021, 또는 가상 단백질 CD1021의 단편에 결합되는 단리된 항체.

청구항 7

제6항에 있어서, 아미노산 잔기 505 내지 604를 포함하는 가상 단백질 CD1021의 단편에 결합되는 단리된 항체.

청구항 8

서열 번호 2의 아미노산 서열에 결합되는 단리된 항체.

청구항 9

제6항에 있어서, 아미노산 잔기 30 내지 120을 포함하는 가상 단백질 CD1021의 단편에 결합되는 단리된 항체.

청구항 10

서열 번호 9의 아미노산 서열에 결합되는 단리된 항체.

청구항 11

제6항에 있어서, 아미노산 잔기 194 내지 293을 포함하는 가상 단백질 CD1021의 단편에 결합되는 단리된 항체.

청구항 12

서열 번호 10의 아미노산 서열에 결합되는 단리된 항체.

청구항 13

제6항에 있어서, 아미노산 잔기 203 내지 217을 포함하는 가상 단백질 CD1021의 단편에 결합되는 단리된 항체.

청구항 14

제6항에 있어서, 아미노산 잔기 333 내지 347을 포함하는 가상 단백질 CD1021의 단편에 결합되는 단리된 항체.

청구항 15

아미노산 서열 EGSSLQYKGDDPESY (서열 번호 3)에 결합되는 단리된 항체.

청구항 16

아미노산 서열 LKNETYKTKYHKYLE (서열 번호 4)에 결합되는 단리된 항체.

청구항 17

서열 번호 5를 갖는 클로스트리듐 디피실레 균주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질 또는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합되는 단리된 항체.

청구항 18

제17항에 있어서, 아미노산 잔기 294 내지 393을 포함하는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합되는 단리된 항체.

청구항 19

서열 번호 6의 아미노산 서열에 결합되는 단리된 항체.

청구항 20

제17항에 있어서, 아미노산 잔기 582 내지 596을 포함하는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합되는 단리된 항체.

청구항 21

제17항에 있어서, 아미노산 잔기 64 내지 78을 포함하는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합되는 단리된 항체.

청구항 22

아미노산 서열 YKLKDKNGGTTKTVA (서열 번호 7)에 결합되는 단리된 항체.

청구항 23

아미노산 서열 KFKEKPDADSIKLKY (서열 번호 8)에 결합되는 단리된 항체.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 다클론 항체인 단리된 항체.

청구항 25

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 단클론 항체인 단리된 항체.

청구항 26

제25항의 단클론 항체가 그의 항원 표적에 결합하는 것을 저해하는 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 포자 또는 클로스트리듐 스포로게네스(*Clostridium sporogenes*) 포자에 결합되지 않는 단리된 항체.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 단리된 항체의 항원 결합 단편.

청구항 29

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항 또는 제28항에 있어서, 표지된 단리된 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 단리된 항체 중 하나 이상을 함유하는 조성물.

청구항 31

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 단리된 항체 중 하나 이상을 포함하는 키트.

청구항 32

제25항 또는 제26항의 단클론 항체를 생성하는 하이브리도마(hybridoma) 세포주 또는 형질전환된 B 세포주.

청구항 33

제25항 또는 제26항의 단클론 항체의 중쇄, 경쇄, 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역, 또는 하나 이상의 상보성 결정 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 34

제33항의 단리된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터.

청구항 35

제34항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 36

씨. 디피실레 게놈에 의해 코딩되는 단백질의 적어도 일부를 포함하는 폴리펩티드에 대하여 항체 반응을 생성하기에 유효한 양으로 상기 폴리펩티드를 이용하여 숙주 유기체를 면역화하는 단계를 포함하는, 항-클로스트리듐 디피실레 항체를 제조하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 씨. 디피실레 게놈에 의해 코딩되는 단백질의 적어도 일부를 포함하는 폴리펩티드가 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서열 번호 10의 폴리펩티드 및 그의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 38

면역적격성(immunocompetent) 숙주 유기체에서 씨. 디피실레 게놈에 의해 코딩되는 단백질의 적어도 일부를 코딩하는 핵산 서열을 발현시키는 단계를 포함하는, 항-클로스트리듐 디피실레 항체를 제조하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 씨. 디피실레 게놈에 의해 코딩되는 단백질의 적어도 일부를 코딩하는 핵산 서열이 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서열 번호 10의 서열 및 그의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코딩하는 방법.

청구항 40

제36항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 제제를 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 41

각각 클로스트리듐 디피실레 포자의 다른 항원성 에피토프(epitope)에 결합되는 2종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 함유하는 조성물.

청구항 42

제41항에 있어서, 1종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 1을 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021, 또는 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편에 결합되는 조성물.

청구항 43

제41항에 있어서, 1종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 5를 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질, 또는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합되는 조성물.

청구항 44

제41항에 있어서, 단리된 제1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 1을 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021, 또는 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편에 결합되며, 단리된 제2 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 5를 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질, 또는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합되는 조성물.

청구항 45

제42항 또는 제43항에 있어서, 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편이 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 9, 서열 번호 10의 폴리펩티드 및 그의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 46

제43항 또는 제45항에 있어서, 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 폴리펩티드 단편이 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8의 폴리펩티드 및 그의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 47

각각 클로스트리듐 디피실레 포자의 다른 항원성 에피토프에 결합되는 2종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 키트.

청구항 48

제47항에 있어서, 1종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 1을 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021, 또는 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편에 결합되는 키트.

청구항 49

제47항에 있어서, 1종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 5를 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질, 또는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합되는 키트.

청구항 50

제47항에 있어서, 단리된 제1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 1을 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021, 또는 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편에 결합되며, 단리된 제2 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 5를 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질, 또는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합되는 키트.

청구항 51

제48항 또는 제50항에 있어서, 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편이 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 9, 서열 번호 10의 폴리펩티드 및 그의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 키트.

청구항 52

제49항 또는 제50항에 있어서, 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 폴리펩티드 단편이 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8의 폴리펩티드 및 그의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 키트.

청구항 53

샘플을 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 단리된 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 샘플에서 클로스트리듐 디피실레 포자의 존재를 탐지하는 방법.

청구항 54

각각 씨. 디피실레 포자의 다른 항원성 에피토프에 결합되는 2종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 샘플을 접촉시키는 단계를 포함하는, 샘플에서 클로스트리듐 디피실레 포자의 존재를 탐지하는 방법.

청구항 55

샘플을 씨. 디피실레 포자의 제1 항원성 에피토프에 결합되는 단리된 제1 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계, 및

샘플을 씨. 디피실레 포자의 제2 항원성 에피토프에 결합되는 단리된 제2 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계를 포함하는, 샘플에서 클로스트리듐 디피실레 포자의 존재를 탐지하는 방법.

청구항 56

제54항 또는 제55항에 있어서, 1종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 1을 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021, 또는 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편에 결합되는 방법.

청구항 57

제54항 또는 제55항에 있어서, 1종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 5를 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질, 또는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합되는 방법.

청구항 58

제54항 또는 제55항에 있어서, 단리된 제1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 1을 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021, 또는 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편에 결합되며, 단리된 제2 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 5를 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질, 또는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합되는 방법.

청구항 59

제56항 또는 제58항에 있어서, 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편이 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 9, 서열 번호 10의 폴리펩티드 및 그의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 60

제57항 또는 제58항에 있어서, 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 폴리펩티드 단편이 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8의 폴리펩티드 및 그의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

명세서

배경기술

[0001]

관련 출원과의 상호 참조

[0002]

본 출원은 본 명세서에 참고로 포함된, 2008년 2월 28일자로 출원된 미국 가특허 출원 제61/032,270호의 이득을 청구한다.

[0003]

포자를 형성하는 혐기성 그람-양성 박테리아인 클로스트리듐 디피실레(*Clostridium difficile*)는 인간에 있어서 위막성 대장염(pseudomembranous colitis) 및 항생제 관련 설사의 주요 원인이며, 병원 획득성 원내 감염(hospital acquired, nosocomial infection)에 연루된 가장 널리 퍼진 박테리아 중 하나이다 (예를 들어, 문헌 [Wren, 2006, Future Microbiol; 1(3):243-245] 참조). 미국 질병 통제 센터(Center for Disease Control, CDC)에 따르면, 씨. 디피실레는 미국에서 매해 적어도 5,000건의 사망 및 수만 건의 설사 사례에 책임이 있다. 씨. 디피실레 감염자의 수는 1993년과 2003년 사이에 배가 되었으며, 이때 가장 큰 증가는 2000년 이후에 나타났다.

[0004]

씨. 디피실레 관련 질환을 갖는 개체는 대변에 포자를 방출한다. 씨. 디피실레 감염은 빈번하게는 입원한 환자들 사이에서 옮겨지며, 이 유기체는 흔히 병원 직원의 손에 존재한다 (예를 들어, 문헌[McFarland et al.,

1989, N Engl J Med; 320:204-210] 참조). 씨. 디피실레 감염에 의해 감염된 환자는 격리되며, 급증을 피하기 위하여 예방 조치가 취해진다. 무증상 보균자는 포자를 방출할 수 있으며, 격리 목적으로 스크리닝될 필요가 있을 수 있다 (예를 들어, 문헌[Kyne et al., 2000, N Engl J Med; 342:390-397] 참조).

[0005] 씨. 디피실레 포자는 열, 건조 및 세정제에 대하여 내성이 있으며, 환경 표면, 예를 들어 카트 손잡이, 베드레일(bedrail), 환자용 변기(bedpan), 변기(toilet), 욕조, 바닥(floor), 가구, 리넨류, 전화기, 청진기, 온도계, 및 리모콘(remote control) 상에서 최대 70일간 생존할 수 있다. 따라서, 환경 표면은 준비된 감염원이다. 입원 동안 병실의 철저한 청소가 필요하다.

[0006] 청소의 유효성을 모니터링하고 병실 및 환경 표면에 씨. 디피실레 포자가 없는 것을 확인하는 것이 명백하게 필요하다. 현재, 환경 샘플 및 환자 샘플에서 씨. 디피실레 포자를 신속하게 검출하는 방법을 사용하는 것은 전혀 용이하지 않다. 현재 키트 (면역분석 및 분자적 분석 둘 모두)가 씨. 디피실레 독소의 검출용으로 구매가능하지만, 이들 키트는 씨. 디피실레 포자를 검출하지 못한다. 따라서, 씨. 디피실레 포자의 검출 시스템을 신속하게 그리고 용이하게 사용할 필요가 있다.

발명의 내용

[0007] 본 발명은 클로스트리듐 디피실레 포자에 결합되는 단리된 항체를 포함한다. 몇몇 실시 형태에서, 상기 포자는 미발아(ungerminated) 포자이다. 몇몇 실시 형태에서, 상기 포자는 발아된 포자이다. 몇몇 실시 형태에서, 항체는 클로스트리듐 디피실레 영양 세포에 결합되지 않는다. 몇몇 실시 형태에서, 항체는 씨. 디피실레 독소에 결합되지 않는다.

[0008] 본 발명은 서열 번호 1을 갖는 클로스트리듐 디피실레 균주(strain) 630의 가상 단백질 CD1021, 또는 가상 단백질 CD1021의 단편에 결합되는 단리된 항체를 포함한다. 몇몇 실시 형태에서, 상기 단리된 항체는 아미노산 잔기 505 내지 604를 포함하는 가상 단백질 CD1021의 단편에 결합된다. 몇몇 실시 형태에서, 상기 단리된 항체는 아미노산 잔기 30 내지 120을 포함하는 가상 단백질 CD1021의 단편에 결합된다. 몇몇 실시 형태에서, 상기 단리된 항체는 아미노산 잔기 194 내지 293을 포함하는 가상 단백질 CD1021의 단편에 결합된다. 몇몇 실시 형태에서, 상기 단리된 항체는 아미노산 잔기 203 내지 217을 포함하는 가상 단백질 CD1021의 단편에 결합된다. 몇몇 실시 형태에서, 상기 단리된 항체는 아미노산 잔기 333 내지 347을 포함하는 가상 단백질 CD1021의 단편에 결합된다.

[0009] 본 발명은 서열 번호 2의 아미노산 서열에 결합되는 단리된 항체를 포함한다.

[0010] 본 발명은 서열 번호 9의 아미노산 서열에 결합되는 단리된 항체를 포함한다.

[0011] 본 발명은 서열 번호 10의 아미노산 서열에 결합되는 단리된 항체를 포함한다.

[0012] 본 발명은 아미노산 서열 EGSSLQYKGDPESEY (서열 번호 3)에 결합되는 단리된 항체를 포함한다.

[0013] 본 발명은 아미노산 서열 LKNETYKTKYHKYLE (서열 번호 4)에 결합되는 단리된 항체를 포함한다.

[0014] 본 발명은 서열 번호 5를 갖는 클로스트리듐 디피실레 균주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질 또는 상기 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합되는 단리된 항체를 포함한다. 몇몇 실시 형태에서, 상기 단리된 항체는 아미노산 잔기 294 내지 393을 포함하는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합된다. 몇몇 실시 형태에서, 상기 단리된 항체는 아미노산 잔기 582 내지 596을 포함하는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합된다. 몇몇 실시 형태에서, 상기 단리된 항체는 아미노산 잔기 64 내지 78을 포함하는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합된다.

[0015] 본 발명은 서열 번호 6의 아미노산 서열에 결합되는 단리된 항체를 포함한다.

[0016] 본 발명은 아미노산 서열 YKLKDKNGGTTKTVA (서열 번호 7)에 결합되는 단리된 항체를 포함한다.

[0017] 본 발명은 아미노산 서열 KFKEKPDADSIKLKY (서열 번호 8)에 결합되는 단리된 항체를 포함한다.

[0018] 본 발명은 본 발명의 항체가 그의 항원 표적에 결합되는 것을 저해하는 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0019] 본 발명은 본 발명의 단리된 항체의 항원 결합 단편을 포함한다.

- [0020] 몇몇 실시 형태에서, 본 발명의 단리된 항체는 다클론 항체이다. 몇몇 실시 형태에서, 본 발명의 단리된 항체는 단클론 항체이다. 몇몇 실시 형태에서, 본 발명의 단리된 항체는 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 포자 또는 클로스트리듐 스포로게네스(*Clostridium sporogenes*) 포자에 결합되지 않는다. 몇몇 실시 형태에서, 본 발명의 항체 및 항체 결합 단편은 표지된다.
- [0021] 본 발명은 본 발명의 단리된 항체들 중 하나 이상, 또는 그의 항원 결합 단편을 함유하는 조성물을 포함한다.
- [0022] 본 발명은 본 발명의 단리된 항체들 중 하나 이상, 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 키트를 포함한다.
- [0023] 본 발명은 본 발명의 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주 또는 형질전환된 B 세포주를 포함한다.
- [0024] 본 발명은 본 발명의 단클론 항체의 중쇄, 경쇄, 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역, 또는 하나 이상의 상보성 결정 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 본 발명은 그러한 단리된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 본 발명은 그러한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 포함한다.
- [0025] 본 발명은 씨. 디피실레 게놈에 의해 코딩되는 단백질의 적어도 일부를 포함하는 폴리펩티드에 대하여 항체 반응을 생성하기에 유효한 양으로 상기 폴리펩티드를 이용하여 숙주 유기체를 면역화하는 단계를 포함하는, 항-클로스트리듐 디피실레 항체를 제조하는 방법을 포함한다. 몇몇 실시 형태에서, 씨. 디피실레 게놈에 의해 코딩되는 단백질의 적어도 일부를 포함하는 폴리펩티드는 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서열 번호 10의 폴리펩티드 및 그의 단편으로부터 선택된다. 몇몇 실시 형태에서, 본 방법은 항체 제제를 정제하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0026] 본 발명은 면역적격성(immunocompetent) 숙주 유기체에서 씨. 디피실레 게놈에 의해 코딩되는 단백질의 적어도 일부를 코딩하는 핵산 서열을 발현시키는 단계를 포함하는, 항-클로스트리듐 디피실레 항체를 제조하는 방법을 포함한다. 몇몇 실시 형태에서, 씨. 디피실레 게놈에 의해 코딩되는 단백질의 적어도 일부를 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서열 번호 10의 서열 및 그의 단편으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코딩한다. 몇몇 실시 형태에서, 본 방법은 항체 제제를 정제하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0027] 본 발명은 2종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 함유하는 조성물을 포함하며, 여기서 각각의 단리된 항체는 클로스트리듐 디피실레 포자의 다른 항원성 에피토프에 결합된다.
- [0028] 조성물의 몇몇 실시 형태에서, 1종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 1을 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021, 또는 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편에 결합된다. 몇몇 실시 형태에서, 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편은 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 9, 서열 번호 10의 폴리펩티드 및 그의 단편으로부터 선택된다.
- [0029] 조성물의 몇몇 실시 형태에서, 1종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 5를 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질, 또는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합된다. 몇몇 실시 형태에서, 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 폴리펩티드 단편은 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8의 폴리펩티드 및 그의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0030] 조성물의 몇몇 실시 형태에서, 단리된 제1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 1을 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021, 또는 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편에 결합되며, 단리된 제2 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 5를 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질, 또는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합된다. 몇몇 실시 형태에서, 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편은 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 9, 서열 번호 10의 폴리펩티드 및 그의 단편으로부터 선택된다. 몇몇 실시 형태에서, 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 폴리펩티드 단편은 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8의 폴리펩티드, 및 그의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0031] 본 발명은 2종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 키트를 포함하며, 여기서 각각의 단리된 항체는 클로스트리듐 디피실레 포자의 다른 항원성 에피토프에 결합된다.
- [0032] 키트의 몇몇 실시 형태에서, 1종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 1을 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021, 또는 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편에 결합된다. 몇몇 실시 형태

태에서, 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편은 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 9, 서열 번호 10의 폴리펩티드 및 그의 단편으로부터 선택된다.

[0033] 키트의 몇몇 실시 형태에서, 1종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 5를 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질, 또는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합된다. 몇몇 실시 형태에서, 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 폴리펩티드 단편은 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8의 폴리펩티드 및 그의 단편으로부터 선택된다.

[0034] 키트의 몇몇 실시 형태에서, 단리된 제1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 1을 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021, 또는 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편에 결합되며, 단리된 제2 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 5를 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질, 또는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합된다. 몇몇 실시 형태에서, 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편은 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 9, 서열 번호 10의 폴리펩티드 및 그의 단편으로부터 선택된다. 몇몇 실시 형태에서, 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 폴리펩티드 단편은 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8의 폴리펩티드 및 그의 단편으로부터 선택된다.

[0035] 본 발명은 샘플을 본 발명의 하나 이상의 단리된 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 샘플에서 클로스트리듐 디피실레 포자의 존재를 탐지하는 방법을 포함한다.

[0036] 본 발명은 샘플을 2종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편 - 여기서, 각각의 단리된 항체는 씨. 디피실레 포자의 다른 항원성 에피토프에 결합됨 - 과 접촉시키는 단계를 포함하는, 샘플에서 클로스트리듐 디피실레 포자의 존재를 탐지하는 방법을 포함한다.

[0037] 본 발명은 샘플을 씨. 디피실레 포자의 제1 항원성 에피토프에 결합되는 단리된 제1 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계, 및 샘플을 씨. 디피실레 포자의 제2 항원성 에피토프에 결합되는 단리된 제2 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계를 포함하는, 샘플에서 클로스트리듐 디피실레 포자의 존재를 탐지하는 방법을 포함한다.

[0038] 본 발명의 방법의 몇몇 실시 형태에서, 1종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 1을 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021, 또는 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편에 결합된다. 몇몇 실시 형태에서, 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편은 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 9, 서열 번호 10의 폴리펩티드 및 그의 단편으로부터 선택된다.

[0039] 본 발명의 방법의 몇몇 실시 형태에서, 1종 이상의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 5를 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질, 또는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합된다. 몇몇 실시 형태에서, 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 폴리펩티드 단편은 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8의 폴리펩티드 및 그의 단편으로부터 선택된다.

[0040] 본 발명의 방법의 몇몇 실시 형태에서, 단리된 제1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 1을 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021, 또는 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편에 결합되며, 단리된 제2 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 5를 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질, 또는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 단편에 결합된다. 몇몇 실시 형태에서, 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편은 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 9, 서열 번호 10의 폴리펩티드 및 그의 단편으로부터 선택된다. 몇몇 실시 형태에서, 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질의 폴리펩티드 단편은 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8의 폴리펩티드 및 그의 단편으로부터 선택된다.

[0041] 달리 특정되지 않으면, 부정관사("a", "an"), 정관사("the"), 및 "1종 이상"은 서로 바꾸어서 사용될 수 있으며, 하나 또는 하나 초과를 의미한다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 씨. 디피실레 균주 630 (서열 번호 1, 젠뱅크(GenBank) 등록 번호 YP_001087502에 상응함), 씨. 디피실레 QCD-32g58 (서열 번호 11, 젠뱅크 등록 번호 ZP_01804840에 상응함), 씨. 디피실레 QCD-32g58 (서열 번호 12, 젠뱅크 등록 번호 ZP_01804841에 상응함), 씨. 디피실레 QCD-32g58 (서열 번호 21, 젠뱅크 등록 번호

NZ_AAML04000007의 뉴클레오티드 461827 내지 462825에 상응하는 영역으로부터 번역됨), 씨. 디피실레 QCD-32g58 (서열 번호 22, 젠뱅크 등록 번호 NZ_AAML04000007의 뉴클레오티드 462824 내지 463732에 상응하는 영역으로부터 번역됨), 및 씨. 디피실레 QCD-66c26 (서열 번호 23, 젠뱅크 등록 번호 NZ_Abfd01000037의 뉴클레오티드 15690 내지 17597에 상응하는 영역의 상보체로부터 번역됨) 유래의 가상 단백질 CD1021 단백질들의 아미노산 서열들 사이의 상동성을 나타낸다. 이 서열들은 다중 서열 정렬 프로그램 CustalW를 사용하여 정렬되었는데, 상기 CustalW는 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/custalw/>에서 공식적으로 이용가능하다. 예시된 콘센서스 (consensus) 서열은 서열 번호 38의 서열이다. 6가지의 가상 단백질 중 적어도 4가지에서 동일한 아미노산 잔기가 콘센서스 서열에 예시되어 있다. 콘센서스 서열 중 "X" 잔기는 정렬된 서열들 중 2개 이상이 각각의 잔기에서 비동일성을 보였음을 나타내거나, 또는 이것은 서열 정보가 정렬된 서열들 중 3개 이상에서 각각의 잔기에 있어서 결여되어 있었음을 나타낸다. 정렬된 서열들 중 하나에서 임의의 주어진 위치에 위치한 "o" 기호는 아미노산 위치가 상응하는 젠뱅크 엔트리(entry)에서 보고되어 있지 않았음을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 본 발명은 클로스트리듐 디피실레 (본 명세서에서 "씨. 디피실레", "C. diff", "c. diff", "C-diff", 또는 "C.D"로도 지칭됨) 박테리아의 내세포자(endospore)에 결합되는 항체에 관한 것이다. 그러한 포자-특이적 항체는 예를 들어 환경 샘플, 생물 샘플 및 식품 샘플에서의 씨. 디피실레 내세포자의 검출에 유용하다. 단지 약간의 박테리아 속, 예를 들어 바실루스 및 클로스트리듐이 내세포자를 형성할 수 있다. 박테리아 내세포자는 적대적인 물리적 및 화학적 조건에 대하여 고도로 내성이 있으며, 이는 자연에서 발견되는 가장 내구성 있는 세포 유형들 중 하나임을 입증하는 것이다. 박테리아 내세포자는 높은 열, 건조, 방사선, 및 많은 해로운 화학물질에서 생존할 수 있으며, 박테리아의 휴면 형태인데, 이는 박테리아가 차선의 환경 조건에서 생존하는 것을 허용한다. 내세포자는 매우 긴 시간 동안 생존할 수 있으며 그 후 발아로 칭해지는 과정인 생육 상태(growing state)로 되돌아갈 수 있다. 내세포자는 열, 방사선, 소독제, 및 건조작용에 대해 내성을 갖기 때문에, 내세포자는 의료 및 제약 재료로부터의 제거가 어려우며, 빈번한 오염 원인이다.

[0044] 본 발명의 항체는 씨. 디피실레 박테리아의 내세포자 (본 명세서에서 "포자"로도 지칭됨)에 결합된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "항체" 또는 "항체류"는 서로 바꾸어서 사용될 수 있다. 본 발명의 항체는 생육가능한(viable) 포자 및 불활성화된 씨. 디피실레 포자 둘 모두에 결합될 수 있다. 포자는 예를 들어 포르말린, 포름알데히드, 글루타르알데히드, 화학적 소독제, 오토클레이빙(autoclaving) 및 자외선을 이용한 처리를 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 다양한 방법에 의해 불활성화될 수 있다. 본 발명의 항체는 발아 및 미발아 씨. 디피실레 포자 둘 모두에 결합될 수 있다. 본 발명의 항체는 미발아 씨. 디피실레 포자에 결합될 수 있으며 발아 씨. 디피실레 포자에는 결합될 수 없다. 본 발명의 항체는 발아 씨. 디피실레 포자에 결합될 수 있으며 미발아 씨. 디피실레 포자에는 결합될 수 없다. 미발아 포자 및 발아 포자의 준비 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 간략하게는, 박테리아 포자는 일반적으로 대부분의 세포가 포자로 변할 때까지 트립신 처리 대두 한천(tryptic soy agar)과 같은 배지 상에서 또는 트립신 처리 대두 액체배지(broth)에서 박테리아를 성장 시킴으로써 준비된다. 포자는 원심분리에 의해 수집되며 PBS와 같은 완충액을 이용하여 수회 세척된다. 당해 현탁물을 알코올로 처리하여 영양 세포를 사멸시키고, 세척하여 포자를 수집할 수 있다 (예를 들어, 문헌[Long and Williams, 1958, J Bacteriol; 76:332] 및 문헌[Powers, 1968, Appl Microbiol; 16:180-181] 참조). 포자 발아는 다양한 방법에 의해 촉발될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Gould, 1970, J Appl Bacteriol; 33:34-49]; 문헌[Foerster and Foster, 1966, J Bacteriol; 91:1168-1177]; 문헌[Moir and Smith, 1990, Ann Rev Microbiol; 44:531-553]; 및 미국 특허 출원 공개 제2003/0175318A1호를 참조하라.

[0045] 본 발명의 항체는 씨. 디피실레 포자에는 결합될 수 있으며 다른 내세포자-형성 박테리아의 포자에는 결합될 수 없다. 본 발명의 항체는 씨. 디피실레 포자에 결합될 수 있으며 피르미쿠테 필럼(*Firmicute phylum*)의 다른 내세포자-형성 박테리아의 포자, 예를 들어 클로스트리듐 또는 바실루스 속의 임의의 다양한 종에 의해 생성되는 내세포자에는 결합될 수 없다. 클로스트리듐 및 바실루스 속의 박테리아의 종은 클로스트리듐 아세트icum(*Clostridium aceticum*), 클로스트리듐 아세트부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 클로스트리듐 부티리쿰(*Clostridium butyricum*), 클로스트리듐 카르니스(*Clostridium carnis*), 클로스트리듐 차우보에이(*Clostridium chauvoei*), 클로스트리듐 테니트리피칸스(*Clostridium denitrificans*), 클로스트리듐 페르비두스(*Clostridium fervidus*), 클로스트리듐 포르미코아세트icum(*Clostridium formicoaceticum*), 클로스트리듐 노비이(*Clostridium novyi*), 클로스트리듐 파스테우리아눔(*Clostridium pasteurianum*), 클로스트리듐 페르프린젠스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리듐 셉티쿰(*Clostridium septicum*), 클로스트리듐 스포로게네스, 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*), 클로스트리

덥 서모아세트쿰(*Clostridium thermoaceticum*), 클로스트리덤 서모셀룸(*Clostridium thermocellum*), 클로스트리덤 서모사크로라이티쿰(*Clostridium thermosacchrolyticum*), 클로스트리덤 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*), 클로스트리덤 웰치이(*Clostridium welchii*), 바실루스 아가라드하에렌스(*Bacillus agaradhaerens*), 바실루스 알칼로필루스(*Bacillus alcalophilus*), 바실루스 아밀로리쿠에파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*), 바실루스 안트라키스(*Bacillus anthracis*), 바실루스 아트로파에우스(*Bacillus atrophaeus*), 바실루스 아조토포르만스(*Bacillus azotoformans*), 바실루스 바디우스(*Bacillus badius*), 바실루스 벤조에보란스(*Bacillus benzoovorans*), 바실루스 카르보니필루스(*Bacillus carboniphilus*), 바실루스 케레우스(*Bacillus cereus*), 바실루스 키티노라이티쿠스(*Bacillus chitinolyticus*), 바실루스 키르쿨란스(*Bacillus circulans*), 바실루스 클라르키이(*Bacillus clarkii*), 바실루스 클라우시이(*Bacillus clausii*), 바실루스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*), 바실루스 코흐니이(*Bacillus cohnii*), 바실루스 에다피쿠스(*Bacillus edaphicus*), 바실루스 에히멘시스(*Bacillus ehimensis*), 바실루스 파스티디오수스(*Bacillus fastidiosus*), 바실루스 피르무스(*Bacillus firmus*), 바실루스 플렉수스(*Bacillus flexus*), 바실루스 푸마리올리(*Bacillus fumarioli*), 바실루스 푸시포르미스(*Bacillus fusiformis*), 바실루스 김소니이(*Bacillus gibsonii*), 바실루스 글로비스포루스(*Bacillus globisporus*), 바실루스 할마팔루스(*Bacillus halmaphalus*), 바실루스 할로알칼리필루스(*Bacillus haloalkaliphilus*), 바실루스 할로데니트리피칸스(*Bacillus halodenitrificans*), 바실루스 할로두란스(*Bacillus halodurans*), 바실루스 할로필루스(*Bacillus halophilus*), 바실루스 호리코쉬이(*Bacillus horikoshii*), 바실루스 호르티(*Bacillus horti*), 바실루스 인페르노스(*Bacillus infernos*), 바실루스 인솔리투스(*Bacillus insolitus*), 바실루스 카우스토피루스(*Bacillus kaustophilus*), 바실루스 라에보락티쿠스(*Bacillus laevolacticus*), 바실루스 렌투스(*Bacillus lentus*), 바실루스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실루스 마리누스(*Bacillus marinus*), 바실루스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), 바실루스 메타놀리쿠스(*Bacillus methanolicus*), 바실루스 모자벤시스(*Bacillus mojavensis*), 바실루스 뮤실라기노수스(*Bacillus mucilaginosus*), 바실루스 마이코이데스(*Bacillus mycoides*), 바실루스 나가노엔시스(*Bacillus naganoensis*), 바실루스 니아시니(*Bacillus niacin*), 바실루스 올레로니우스(*Bacillus oleronius*), 바실루스 팔리두스(*Bacillus pallidus*), 바실루스 파스테우리이(*Bacillus pasteurii*), 바실루스 슈도알칼리필루스(*Bacillus pseudocaliphilus*), 바실루스 슈도피르무스(*Bacillus Pseudofirmus*), 바실루스 슈도마이코이데스(*Bacillus pseudomycoides*), 바실루스 사이크로필루스(*Bacillus psychrophilus*), 바실루스 사이크로사카로라이티쿠스(*Bacillus psychrosaccharolyticus*), 바실루스 푸밀루스(*Bacillus pumilus*), 바실루스 스크레겔리이(*Bacillus schlegelii*), 바실루스 실베스트리스(*Bacillus silvestris*), 바실루스 심플렉스(*Bacillus simplex*), 바실루스 시랄리스(*Bacillus siralis*), 바실루스 스미티이(*Bacillus smithii*), 바실루스 스파에리쿠스(*Bacillus sphaericus*), 바실루스 스포로서모두란스(*Bacillus sporothermodurans*), 바실루스 스테아로서모필루스(*Bacillus stearothermophilus*), 바실루스 서브틸리스, 바실루스 서모아밀로보란스(*Bacillus thermoamylovorans*), 바실루스 서모카테놀라투스(*Bacillus thermocatenulatus*), 바실루스 서모클로아세아에(*Bacillus thermocloaceae*), 바실루스 서모데니트리피칸스(*Bacillus thermodenitrificans*), 바실루스 서모글루코시다시우스(*Bacillus thermoglucosidasius*), 바실루스 서모레오보란스(*Bacillus thermoleovorans*), 바실루스 서모스파에리쿠스(*Bacillus thermosphaericus*), 바실루스 튜링지엔시스(*Bacillus thuringiensis*), 바실루스 투스키아에(*Bacillus tusciae*), 바실루스 발리스모르티스(*Bacillus vallismortis*), 바실루스 베데리(*Bacillus vedderi*), 바실루스 볼카니(*Bacillus vulcani*), 및 바실루스 웨이헨스테판넨시스(*Bacillus weihenstephanensis*)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0046] 본 발명의 항체는 씨. 디피실레 포자에 결합될 수 있으며, 예를 들어 데술포토마쿨룸(*Desulfotomaculum*), 스포로락토바실루스(*Sporolactobacillus*), 브레비바실루스(*Brevibacillus*), 스포로사르키나(*Sporosarcina*), 및 서모악티노마이세스(*Thermoactinomyces*)와 같은 기타 박테리아의 포자에는 결합될 수 없다.

[0047] 몇몇 실시 형태에서, 본 발명의 항체는 씨. 디피실레 포자에 결합되며, 바실루스 서브틸리스 (본 명세서에서 비. 서브틸리스로도 지칭됨) 및 클로스트리덤 스포로게네스 (본 명세서에서 씨. 스포로게네스으로도 지칭됨)의 포자에는 결합되지 않는다.

[0048] 본 발명의 항체는 씨. 디피실레 포자에 결합될 수 있으며 씨. 디피실레 영양 세포에는 결합될 수 없다. 본 발명의 항체는 씨. 디피실레 포자에 결합될 수 있으며, 본 명세서에 기재된 것들 중 임의의 것을 포함하는 기타 내생포자-형성 박테리아의 영양 세포에는 결합될 수 없다. 몇몇 실시 형태에서, 본 발명의 항체는 씨. 디피실레, 비. 서브틸리스, 및 씨. 스포로게네스의 영양 세포에 결합되지 않는다. 씨. 디피실레, 씨. 스포로게네스, 및 비. 서브틸리스를 포함하지만 이에 한정되지 않는 매우 다양한 클로스트리덤 및 바실루스 종의 영양 세포를 배양하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Madigan et al., 2003, Brock Biology of

Microorganisms, Prentice Hall]; 및 문헌[Cappucino, 2005, Microbiology Laboratory Manual, Benjamin Cummings]을 참조하라.

- [0049] 병원성 *씨. 디피실레* 균주는 다양한 독소를 생성한다. 가장 우수하게 특성화된 것은 장독소(enterotoxin) (독소 A) 및 세포독소(cytotoxin) (독소 B)이며, 이들 두 가지 독소는 감염된 환자에서 보여지는 설사 및 염증에 책임이 있다 (예를 들어, 문헌[Gianfrilli et al., 1984, Microbiologica; 7:375-9] 참조). 본 발명의 항체는 *씨. 디피실레* 포자에 결합될 수 있으며, *씨. 디피실레*에 의해 생성되는 독소에는 결합될 수 없는데, 예를 들어, 본 항체는 독소 A 및/또는 독소 B에 결합될 수 없다. *씨. 디피실레* 독소 A 및 독소 B의 제조 및 항체가 *씨. 디피실레* 독소 A 및/또는 독소 B에 결합되는지를 결정하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 제4,530,833호; 미국 특허 제4,533,630호; 미국 특허 제4,863,852호; 미국 특허 제4,879,218호; 미국 특허 제5,231,003호; 미국 특허 제5,610,023호; 미국 특허 제5,965,375호; 미국 특허 제6,503,722호; 미국 특허 제6,939,548호; 및 미국 특허 제7,179,611호를 참조하라.
- [0050] *씨. 디피실레* 내생포자를 포함하는 박테리아 내생포자는 많은 폴리펩티드의 질서화된 조립에 의해 형성되는 다층형 단백질 구조 내에 싸여져 있다. 내생포자는 4개의 보호층인 코어(core), 외피(cortex), 코트(coat), 및 외막(exosporium)을 포함한다. 내생포자의 최외층은 단백질로 만들어진 얇은 커버링(covering)인 외막이다. 이것의 내부에는 고도로 가교결합된 케라틴으로 구성된 포자 코트 및 포자-특이적 단백질의 층이 있다. 상기 포자 코트는 많은 유독 분자에 대하여 불투과성이며, 발아에 연루된 효소를 또한 포함할 수 있다. 외피는 포자 코트 아래에 있으며 펩티도글리칸으로 이루어진다. 코어 벽은 외피 아래에 있으며 내생포자의 원형질체 또는 코어를 둘러싸고 있다. 코어는 정상적인 세포 구조, 예를 들어 DNA 및 리보솜을 갖지만, 대사적 불활성이다.
- [0051] 본 발명의 몇몇 실시 형태는 예를 들어 *씨. 디피실레*의 외막 단백질, 포자 코트 단백질, 포자 외피 단백질, 포자 내막 단백질, 또는 포자 코어 단백질과 같은 포자-특이적 단백질에 결합되는 항체를 포함한다. 그러한 항체는 본 명세서에 기재된 피르미쿠테 필름의 하나 이상의 내생포자-형성 박테리아 상에서 발견되는 포자-특이적 단백질에 결합될 수 있다. 몇몇 실시 형태에서, 본 항체는 *씨. 디피실레*에서 발견되는 포자-특이적 단백질에 결합되지만, 예를 들어 *비. 서브틸리스* 및 *씨. 스포로게네스*와 같이, 피르미쿠테 필름의 다른 내생포자-형성 박테리아 이외의 포자-특이적 단백질에는 결합되지 않는다.
- [0052] 본 발명의 몇몇 실시 형태는 *씨. 디피실레*의 포자 코트 조립 단백질에 결합되는 항체를 포함한다. 한 가지 그러한 포자 코트 조립 단백질로는 CotH 단백질 (본 명세서에서 "cotH"로도 지칭됨)이 있다. CotH 단백질은 포자 코트의 구조적 성분이며 *비. 서브틸리스*에서 잘 특성화되었다. 이것은 코트 단백질의 조립의 유도에 그리고 코트 단백질의 안정화에 연루되어 있다. 예를 들어, 문헌[Naclerio et al., 1996, J Bacteriol; 178(15):4375-4380] 및 문헌[Zilha et al., 1999, J Bacteriol; 181:2631-2633]을 참조하라. 본 발명은 *씨. 디피실레*에서의 추정 CotH 단백질에 결합되는 항체를 포함한다.
- [0053] *씨. 디피실레* 균주 630의 전 게놈 서열이 결정되었으며, 미국 국립 생물 공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI), 미국 국립 의학 도서관(National Library of Medicine, NLM), 미국 국립 보건원(National Institutes of Health, NIH)에 의해 유지되는 젠뱅크(등록상표) 서열 데이터베이스에서 이용가능하다. 또한, 문헌[Sebahia et al., 2006, Nat. Genet; 38 (7):779-786]을 참조하라. 균주 630은 다중 약물 내성을 가지며, 1982년에 스위스 취리히에서 동일 병동에서 수십 명의 다른 환자에게 확산된 중증 위막성 대장염을 갖는 환자로부터 단리되었다 (문헌[Wren, 2006, Future Microbiol; 1(3):243-245]). 따라서, 균주 630은 매우 악성이고, 고도로 전염성인 약물 내성 균주의 유전자 속성을 갖는다.
- [0054] 현재 다른 *씨. 디피실레* 균주의 전 게놈 서열을 얻기 위한 노력을 기울이고 있다. 생어 연구소(Sanger Institute) (웰컴 트러스트 게놈 캠퍼스(Wellcome Trust Genome Campus), 영국 캠브리지 힌스턴 소재)에서는 *씨. 디피실레* 균주 R20291의 게놈의 서열이 결정되고 있다. *씨. 디피실레* 균주 R20291은 영국 스톡 맨데빌에서 단리되었으며, 북아메리카 고병원성(North American hypervirulent) BI 균주와 밀접하게 관련된다 (ftp 사이트 sanger.ac.uk/pub/pathogens/cd/C_difficile_Bi_454.dbs를 참조). 워싱턴 유니버시티 인 세인트 루이스(Washington University in St. Louis) (미국 미주리주 세인트 루이스 소재)에서는 *씨. 디피실레* QCD-32g58의 게놈의 서열이 결정되고 있다 (www.cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/GenomePage.cgi?org=ntcd03을 참조).
- [0055] *씨. 디피실레* 균주 630에 대한 모든 젠뱅크(등록상표) 엔트리의 철저한 서치에 의해 가상 단백질 CD1021 (YP_001087502)이 확인되었는데, 이는 *비. 서브틸리스*의 포자 코트 조립 단백질 H (cotH)에 대하여 상동성인 보존된 도메인 (아미노산 잔기 90 내지 393)을 보여준다. 이 분석은 NCBI로부터 이용가능한 그리고 www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml에서 이용가능한 보존 도메인 서치 툴을 사용하여 실시하였다.

씨. 디피실레 630의 가상 단백질 CD1021 (젠뱅크 등록 번호 YP_001087502)은 아미노산 서열 번호 1의 서열을 갖는다. 문헌[Sebahia et al., 2006, Nat. Genet; 38 (7):779-786] 및 www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=126698605를 참조하라.

[0056] 본 발명의 몇몇 실시 형태는 씨. 디피실레의 가상 단백질 CD1021에 결합되는 항체, 및 그의 단편을 포함한다. 본 발명의 항체는 본 명세서에서 논의된 임의의 씨. 디피실레 균주류를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 씨. 디피실레 균주류에서의 가상 단백질 CD1021에 결합될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 씨. 디피실레 균주 630, 씨. 디피실레 균주 R20291, 씨. 디피실레 균주 QCD-32q58, 씨. 디피실레 균주 QCD-66c26, 씨. 디피실레 ATCC 43255, 씨. 디피실레 ATCC 43593, 씨. 디피실레 ATCC 43594, 씨. 디피실레 ATCC 43596, 씨. 디피실레 ATCC 43597, 씨. 디피실레 ATCC 43598, 씨. 디피실레 ATCC 43603, 씨. 디피실레 ATCC 9689, 및/또는 씨. 디피실레 ATCC 700792의 가상 단백질 CD1021에 결합될 수 있다. 본 발명의 항체는 서열 번호 1을 갖는 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021에 결합되는 항체를 포함한다.

[0057] 본 발명의 몇몇 실시 형태는 씨. 디피실레의 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편에 결합되는 항체를 포함한다. 폴리펩티드 단편은 길이가 예를 들어 약 50개, 약 100개, 약 200개, 약 300개, 약 400개, 약 500개, 또는 약 600개 아미노산일 수 있다. 폴리펩티드 단편은 길이가 예를 들어 약 10개, 약 15개, 약 20개, 약 25개, 약 30개, 약 35개, 약 40개, 또는 약 45개 아미노산일 수 있다. 폴리펩티드 단편은 길이가 약 8-20개, 약 12-15개, 또는 약 10-20개 아미노산일 수 있다.

[0058] 본 발명의 몇몇 실시 형태는 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021의 폴리펩티드 단편 (서열 번호 1)에 결합되는 항체를 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021의 505-604 (서열 번호 2)를 포함하는 폴리펩티드에 결합되는 항체, 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021의 잔기 30-120 (서열 번호 9)을 포함하는 폴리펩티드에 결합되는 항체, 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021의 잔기 194-293 (서열 번호 10)을 포함하는 폴리펩티드에 결합되는 항체, 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021의 잔기 203-217 (서열 번호 3)을 포함하는 폴리펩티드에 결합되는 항체, 및 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021의 잔기 333-347 (서열 번호 4)을 포함하는 폴리펩티드에 결합되는 항체를 포함한다.

[0059] 두꺼운 펩티도글리칸 층인 포자 외피는 고도로 탈수된 포자 상태를 유지하는 것에 책임이 있으며, 포자의 극도의 휴면성 및 내열성에 기여한다. 박테리아 포자 발아는 일련의 분해 이벤트를 포함하며, 상기 분해 이벤트는 포자 휴면성이 비가역적으로 손실되게 하고 코어가 재수화되게 한다. 포자는 발아에 연루된 효소를 포함한다. 따라서, 발아에 연루된 포자-특이적 단백질에 결합되는 항체를 사용하여 발아 중인 포자를 확인할 수 있다. 본 발명은 발아에 연루된 포자-특이적 단백질에 결합되는 항체를 포함한다. 그러한 항체는 발아된 포자에는 결합될 수 있지만 미발아된 포자에는 결합될 수 없다. 그러한 항체는 미발아된 포자에는 결합될 수 있지만 발아된 포자에는 결합될 수 없다.

[0060] 아미다아제 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제를 포함하는 외피 용해 효소(cortex lytic enzyme)는 발아에서 중요한 역할을 하며, 이는 외피의 가수분해로 이어진다 (예를 들어, 문헌[Moriyama et al., 1996, J Bacteriol; 181:2373-2378] 참조). 본 발명은 씨. 디피실레 아미다아제에 결합되는 항체를 포함하며, 이는 씨. 디피실레의 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제에 결합되는 항체를 포함한다.

[0061] 씨. 디피실레 균주 630에 대한 모든 젠뱅크(등록상표) 엔트리의 철저한 서치에 의해 보존된 도메인인 CW_binding_2 (추정 세포벽 결합 반복(putative cell wall binding repeat) 2; 174 내지 265, 275 내지 368, 381 내지 461) 및 아미다아제_3 (N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제, 493 내지 673)을 갖는 세포 표면 단백질 (추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제, YP_001087517, 본 명세서에서 "CD1036"으로도 지칭됨)이 확인되었다. 씨. 디피실레 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 세포 표면 단백질 (젠뱅크 등록 번호 YP_001087517)은 아미노산 서열 번호 5를 갖는다. 문헌[Sebahia et al., 2006, Nat. Genet; 38 (7):779-786] 및 www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id를 참조하라.

[0062] 본 발명은 씨. 디피실레의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제에 결합되는 항체, 및 그의 단편을 포함한다. 본 발명의 항체는 본 명세서에서 논의된 임의의 씨. 디피실레 균주류를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 씨. 디피실레 균주류에서의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제에 결합될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 씨. 디피실레 균주 630, 씨. 디피실레 균주 R20291, 씨. 디피실레 균주 QCD-32q58, 씨. 디피실레 ATCC 43255, 씨. 디피실레 ATCC 43593, 씨. 디피실레 ATCC 43594, 씨. 디피실레 ATCC 43596, 씨. 디피실레 ATCC 43597, 씨. 디피실레 ATCC 43598, 씨. 디피실레 ATCC 9689, 및/또는 씨. 디피실레 ATCC 700792의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제에 결합될 수 있다. 본 발명의 항체는 서열 번호 5를 갖는 씨. 디피

실례 군주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제에 결합되는 항체를 포함한다.

[0063] 본 발명의 몇몇 실시 형태는 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제의 폴리펩티드 단편에 결합되는 항체를 포함한다. 폴리펩티드 단편은 길이가 예를 들어 약 50개, 약 100개, 약 200개, 약 300개, 약 400개, 약 500개, 또는 약 600개 아미노산일 수 있다. 폴리펩티드 단편은 길이가 예를 들어 약 10개, 약 15개, 약 20개, 약 25개, 약 30개, 약 35개, 약 40개, 또는 약 45개 아미노산일 수 있다. 폴리펩티드 단편은 길이가 약 8-20개, 약 12-15개, 또는 약 10-20개 아미노산일 수 있다. 본 발명은 서열 번호 5를 갖는 씨. 디피실레 군주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제의 폴리펩티드 단편에 결합되는 항체를 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 씨. 디피실레 군주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제의 잔기 294-393 (서열 번호 6)을 포함하는 폴리펩티드에 결합되는 항체, 씨. 디피실레 군주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제의 잔기 582-596 (서열 번호 7)을 포함하는 폴리펩티드에 결합되는 항체, 및 씨. 디피실레 군주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제의 잔기 64-78 (서열 번호 8)을 포함하는 폴리펩티드에 결합되는 항체를 포함한다.

[0064] 본 발명의 항체는 다클론 항체, 친화성에 의해 정제된 다클론 항체, 단클론 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 항-이디오타입(anti-idiotypic) 항체, 다중특이성 항체, 단쇄 항체, 단쇄 Fv (scFv), 다이설파이드-결합된 Fv (sdFv), Fab 단편, F(ab') 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, 다이아바디(diabody), Fab 발현 라이브러리에 의해 생성되는 선형 항체 단편, VL 또는 VH 도메인 중 어느 하나를 포함하는 단편, 세포내에서 만들어진 항체 (즉, 세포내 항체(intrabody), 및 그의 항원 결합 항체 단편을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 임의의 매우 다양한 표적 항원을 사용하여 본 발명의 항체를 생성할 수 있으며, 이는 씨. 디피실레 세포, 포자 또는 독소, 단백질, 펩티드, 탄수화물 및 그의 조합을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 단백질 및 펩티드는, 예를 들어 자연 발생적이거나, 화학적으로 합성되거나, 또는 재조합에 의해 생성될 수 있다. 항원은 담체에 콘주게이션될 수 있다.

[0065] 일반적으로 온전한 항체의 항원 결합 부위를 포함하고 그에 따라 항원에 결합되는 능력을 유지하는, 단지 온전한 항체의 일부분을 포함하는, 항원 결합 단편으로도 지칭되는 다양한 항체 단편이 본 발명에 또한 포함된다. 단편은 온전한 또는 완전한 항체 또는 항체 사슬의 화학적 또는 효소적 처리를 통하여 얻어질 수 있다. 단편은 또한 재조합적 수단에 의해 얻어질 수 있다. 항체 단편의 예에는 예를 들어 단백질 분해에 의한 소화에 의해 및/또는 다이설파이드 가교를 환원시킴으로써 생성되는 Fab, Fab', Fd, Fd', Fv, dAB, 및 F(ab')₂ 단편 및 Fab 발현 라이브러리로부터 생성되는 단편이 포함된다. 그러한 항체 단편은 당업계에서 잘 알려진 기술에 의해 생성될 수 있다. 본 발명의 항체는 단독의 가변 영역(들) 또는 경첩 영역, CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및/또는 Fc 도메인(들)의 일부분 또는 그 전체와 조합된 가변 영역(들)을 포함할 수 있다. 용어 "항원 결합 단편"은 항원에 결합되거나 또는 항원 결합에 대하여 온전한 항체와 경쟁하는 면역글로불린 또는 항체의 폴리펩티드 단편을 말한다.

[0066] 본 발명의 항체는 면역글로불린 분자의 임의의 유형 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위클래스(subclass)의 것일 수 있다. 몇몇 실시 형태에서, 면역글로불린은 IgG이다. 면역글로불린은 중쇄 및 경쇄 둘 모두를 가질 수 있다. IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY 중쇄의 어레이는 카파 또는 람다 형태의 경쇄와 쌍을 형성할 수 있다.

[0067] 본 발명의 항체는 조류 및 포유류를 비롯하여 임의의 동물 기원으로부터의 것일 수 있다. 몇몇 실시 형태에서, 항체는 인간, 쥐과, 쥐, 당나귀, 양, 토끼, 염소, 기니아 피그(guinea pig), 낙타, 말, 라마, 낙타, 또는 닭 항체이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "인간" 항체는 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 항체를 포함하며, 인간 면역글로불린 라이브러리로부터 단리된 또는 하나 이상의 인간 면역글로불린에 대하여 트랜스제닉(transgenic)인 동물로부터 단리된 항체를 포함한다.

[0068] 본 발명의 항체는 다클론 항체일 수 있다. 용어 "다클론 항체"는 혈장 세포의 하나 초과와 클론으로부터 생성되는 항체를 말한다. 이와 대조적으로, "단클론 항체"는 혈장 세포의 단일 클론으로부터 생성되는 항체를 말한다. 다클론 항체의 제조법은 잘 알려져 있다.

[0069] 표적 항원에 대한 다클론 항체는 임의의 다양한 숙주 동물을 면역원으로 면역화함으로써 얻어질 수 있다. 임의의 매우 다양한 면역화 프로토콜이 사용될 수 있다. 숙주 동물은 임의의 포유류, 예를 들어, 생쥐, 햄스터, 쥐, 토끼, 기니아 피그, 염소, 양, 말, 소, 버팔로, 바이슨, 낙타, 또는 라마일 수 있다. 숙주 동물은 조류, 예를 들어 닭 또는 칠면조일 수 있다. 몇몇 실시 형태에서, 항체 제제는 혈액 샘플로부터 얻어진다기보다는 오히려 다른 유체 공급원, 예를 들어 밀크, 초유, 난백, 또는 난황으로부터 얻어진다. 몇몇 실시 형태에서, 항체

제제는 숙주 동물을 표적 항원으로 면역화합에 의해서가 아니라 오히려 항원에 사전 노출시킨 개체로부터 또는 풀링된(pooled) 혈청으로부터, 예를 들어 풀링된 인간 혈청으로부터 얻어진다.

[0070] 면역화되는 포유류에서 면역원성을 갖는 것으로 공지된 단백질에 면역제를 콘주게이션하는 것이 유용할 수 있다. 그러한 면역원성 단백질의 예에는 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin, KLH), 혈청 알부민, 소과 타이로글로불린, 및 대두 트립신 저해제가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 이용될 수 있는 아쥘반트(adjuvant)의 예에는 프로인트 완전 아쥘반트(Freund's complete adjuvant) 및 MPL-TDM 아쥘반트(모노포스포릴 지질 A, 합성 트레할로스 다이코리노마이콜레이트)가 포함된다. 면역화 프로토콜은 지나친 실험 없이 당업자에 의해 선택될 수 있다.

[0071] 본 발명의 몇몇 실시 형태는 씨. 디피실레 포자에 결합되는 항혈청을 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 항혈청은 응혈 단백질 및 적혈구 세포(red blood cell, RBC)가 제거된, 면역화된 숙주 동물 유래의 혈액을 말한다. 항혈청 (본 명세서에서 "항혈청 제제", "조 항혈청" 또는 "원 항혈청(raw antiserum)"으로도 지칭됨)은 모든 클래스의 면역글로불린뿐만 아니라 기타 다양한 혈청 단백질도 여전히 보유한다. 따라서, 표적 항원을 인식하는 항체 외에, 항혈청은 면역학적 분석에서 때로 비-특이적으로 반응할 수 있는 다양한 비-표적 항원에 대한 항체를 또한 포함한다.

[0072] 본 발명의 몇몇 실시 형태에서, 항체는 농축될 수 있다. 그러한 농축에 의해 당해 제제로부터 비-면역글로불린 단백질이 제거될 수 있고/있거나 샘플 내에서 (예를 들어 IgG와 같은) 하나 이상의 클래스의 면역글로불린이 농축될 수 있다. 임의의 다양한 방법을 사용하여 그러한 농축된 항체를 얻을 수 있으며, 이는 본 명세서에 기재된 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 항체 제제로부터 비-면역글로불린 혈청 단백질을 제거하는 방법 및 IgG 분획물을 농축시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 황산암모늄 침전, 단백질 A 결합, 단백질 G 결합, 또는 카르틸산 침전을 이용하여 IgG 클래스의 항체를 농축시킬 수 있다.

[0073] 본 발명의 항체는 표적 항원에 대해 향상된 친화도를 갖는 항체를 포함한다. 그러한 항체는 항원 친화성 면역흡착에 의해 제조될 수 있다. 항원 친화성 면역흡착은 임의의 다양한 수단에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 항원 친화성 면역흡착은 항원 친화성 컬럼 크로마토그래피에 의해 수행될 수 있다. 컬럼 크로마토그래피는 임의의 기계적 수단에 의해 수행될 수 있으며, 예를 들어 가압을 이용하여 또는 가압을 이용하지 않고서 컬럼 런(run)으로 수행될 수 있거나, 상부로부터 기저부로의 또는 기저부로부터 상부로의 컬럼 런으로 수행될 수 있거나, 또는 컬럼에서의 유체의 유동 방향이 크로마토그래피 과정 동안 반대로 될 수 있다. 대안적으로, 항원 친화성 면역흡착은 컬럼 크로마토그래피 이외의 수단에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 친화성 면역흡착은, 중력, 원심분리 또는 여과를 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 샘플을 로딩, 세척 및 용출시키기 위하여 사용되는 액체로부터 고정 지지체가 분리되어 있는 배치(batch) 공정을 사용하여 수행될 수 있다. 또한 친화성 면역흡착은 샘플 중 몇몇 분자를 다른 것들보다 더 강력하게 흡착하거나 또는 보유하는 필터와 샘플을 접촉시킴으로써 수행될 수 있다. 항원 친화성 컬럼은 임의의 다양한 방법에 의해 준비될 수 있으며, 이는 본 명세서에 기재된 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 항체 제제의 항원 친화성 컬럼에의 결합은 임의의 매우 다양한 면역흡착 방법에 의해 수행될 수 있으며, 이는 본 명세서에 기재된 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 항체 제제의 항원 친화성 컬럼에의 결합은 나트륨, 칼륨, 암모늄, 염화물, 아세트산염, 인산염, 시트르산염, 트리스 완충제 및/또는 중성 근처에서 완충 용량을 갖는 유기 완충제를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 완충제 또는 염에서 일어날 수 있다. 그러한 완충제 및 염의 특정 예에는 예를 들어 트리스, 인산나트륨, 인산칼륨, 인산암모늄, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화암모늄, 시트르산나트륨, 시트르산칼륨, 시트르산암모늄, 아세트산나트륨, 아세트산칼륨 또는 아세트산암모늄이 포함된다.

[0074] 본 발명의 항체는 단클론 항체를 포함한다. 단클론 항체 집단은 균질하다. 제제 중 단클론 항체 전부는 표적 분자 상의 동일한 에피토프를 인식하며, 단클론 항체 전부는 동일한 친화성을 갖는다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "친화성"은 단클론 항체와 그의 항원성 에피토프와의 상호작용의 결합 강도이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "에피토프"는 항체가 결합하는 항원의 부분이다. 친화성이 높을수록 항원과 항체 사이의 회합은 더 단단해지며, 항원이 결합 부위 내에 남아있을 가능성이 더 커지게 된다.

[0075] 본 발명의 단클론 항체는 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 항체, 단쇄 Fv (scFv), 다이설파이드-결합된 Fv (sdFv), Fab 단편, F(ab') 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, 다이아바디, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성되는 선형 항체 단편, VL 또는 VH 도메인 중 어느 하나를 포함하는 단편, 세포내에서 만들어진 항체 (즉 세포내 항체) 및 그의 항원 결합 항체 단편을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0076] 본 발명의 단클론 항체는 동물 (인간, 생쥐, 쥐, 토끼, 햄스터, 염소, 말, 닭 또는 칠면조를 포함하지만, 이에

한정되지 않음)에 의해 생성되거나, 화학적으로 합성되거나, 또는 재조합에 의해 발현될 수 있다. 본 발명의 단클론 항체는 면역글로불린 분자의 정제에 대하여 당업계에서 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들어 크로마토그래피 (예를 들어, 이온 교환, 친화성, 및 크기별 분류(sizing) 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차별적 용해도에 의해 또는 단백질 정제의 임의의 기타 표준 기술에 의해 정제될 수 있다. 게다가, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 정제를 돕기 위하여 본 명세서에 기재되거나, 또는 달리 당업계에 공지된 이질적 폴리펩티드 서열에 융합될 수 있다.

[0077] 본 발명의 단클론 항체는 임의의 아이소타입(isotype)의 것일 수 있다. 본 발명의 단클론 항체는 예를 들어 쥐 IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgD, 또는 IgE일 수 있다. 본 발명의 단클론 항체는 예를 들어 인간 IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, 또는 IgE일 수 있다. 몇몇 실시 형태에서, 단클론 항체는 쥐 IgG2a, IgG1, 또는 IgG3일 수 있다. 본 발명에서, 주어진 중쇄는 카파 또는 람다 형태 중 어느 하나의 경쇄와 쌍을 형성할 수 있다.

[0078] 단클론 항체는 당업자에게 친숙한 다양한 기술에 의해 얻어질 수 있다. 예를 들어, 원하는 항원으로 면역화된 동물 유래의 비장 세포는 대개 골수종 세포와의 융합에 의해 불멸화된다(immortalized) (예를 들어, 문헌[Kohler and Milstein, 1976, Eur J Immunol; 6:511-519]; 문헌[J. Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, " Academic Press, pp 59-103 (1986)]; 및 문헌[Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, page 726 (Cold Spring Harbor Pub. (1988)] 참조). 단클론 항체는 당업계에 잘 알려진 기술에 의해 하이브리도마 배양물로부터 단리 및 정제될 수 있다. 단클론 항체를 생산하는 형질전환된 B 세포주를 생성하는 다른 공지된 방법이 또한 이용될 수 있다. 본 발명의 단클론 항체는 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있으며, 예를 들어 파지 디스플레이(phage display)에 의해 또는 재조합법(combinatorial method)에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,223,409호; 국제특허 공개 WO 92/18619호; 국제특허 공개 WO 91/17271호; 국제특허 공개 WO 92/20791호; 국제특허 공개 WO 92/15679호; 국제특허 공개 WO 93/01288호; 국제특허 공개 WO 92/01047호; 국제특허 공개 WO 92/09690호; 또는 국제특허 공개 WO 90/02809호를 참조하라. 그러한 방법을 사용하여 인간 단클론 항체를 생성할 수 있다.

[0079] 본 발명의 단클론 항체는 키메라 항체를 포함한다. 키메라 항체는 상이한 부분들이 상이한 동물 종들로부터 유래되는 것이다. 예를 들어, 키메라 항체는 적절한 항원 특이성을 갖는 생쥐 항체 분자 유래의 유전자를 적절한 생물학적 특이성의 인간 항체 분자 유래의 유전자와 함께 스플라이싱함으로써 얻어질 수 있다. 예를 들어, 문헌[Takeda et al., 1985, Nature; 314:544-546]을 참조하라.

[0080] 치료적으로 유용한 항체는 "인간화" 단클론 항체로부터 유래될 수 있다. 인간화 단클론 항체는 생쥐 (또는 기타 종) 면역글로불린의 가변 중쇄 및 경쇄로부터의 하나 이상의 CDR을 인간 가변 도메인 내로 전달하고, 이어서 인간 잔기를 쥐와 상대물의 프레임워크 영역(framework region) 내로 치환해 넣음으로써 생성된다. 인간화 단클론 항체로부터 유래되는 항체 구성요소의 사용에 의해 쥐와 불변 영역의 면역원성과 관련된 잠재적인 문제가 없어진다. 인간화 단클론 항체의 제조 기술은, 예를 들어 문헌[Jones et al., 1986, Nature; 321:522] 및 문헌[Singer et al., 1993, J Immunol; 150:2844]에서 찾아볼 수 있다. 본 발명의 인간화 단클론 항체의 불변 영역은 임의의 아이소타입에 속하는 인간 면역글로불린 유래의 것일 수 있다. 이것은 예를 들어 인간 IgG의 불변 영역일 수 있다. 인간 면역글로불린으로부터 유래되는 불변 영역의 프레임워크 영역은 특별히 한정되지 않는다.

[0081] 온전한 항체 분자는 2개의 중쇄(H chain) 가변 영역 (본 명세서에서 VH로 약기됨) 및 2개의 경쇄(L chain) 가변 영역 (본 명세서에서 VL로 약기됨)을 갖는다. VH 및 VL 영역은 "프레임워크 영역" (FR)으로 칭해지는 보다 보존된 영역이 산재되어 있으며, "상보성 결정 영역" ("CDR")으로 칭해지는 초가변성(hypervariability)의 영역들로 추가로 세분될 수 있다. CDR 및 프레임워크 영역의 한도가 정확하게 정의되었다 (문헌[Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242], 및 문헌[Chothia, C. et al., J. Mol. Biol. 1987;196:901-917] 참조). 각각의 VH 및 VL은 하기의 순서로 아미노 말단으로부터 카르복시 말단으로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 본 발명은 본 발명의 단클론 항체의 중쇄, 경쇄, 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역 및/또는 하나 이상의 상보성 결정 영역을 갖는 항체를 포함한다.

[0082] 본 발명은 2특이성 또는 2기능성 항체를 포함한다. 2특이성 또는 2기능성 항체는 2개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍 및 2개의 상이한 결합 부위를 갖는 인공 하이브리드 항체이다. 2특이성 항체는 다양한 방법에 의해 생성될 수 있으며, 이는 하이브리도마들의 융합 또는 F(ab') 단편들의 결합을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Songsivilai

and Lachmann, 1990, Clin Exp Immunol; 79:315-321] 및 문헌[Kostelny et al., 1992, J Immunol; 148:1547-1553]을 참조하라. 게다가, 2특이성 항체는 "다이하바디"로서 (문헌[Holliger et al., 1993, PNAS USA; 90:6444-6448]) 또는 "자누신(Janusin)"으로서 (문헌[Traunecker et al., 1991, EMBO J; 10:3655-3659] 및 문헌[Traunecker et al., 1992, Int J Cancer Suppl; 7:51-52]) 형성될 수 있다.

[0083] 본 발명의 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주, 형질전환된 B 세포주, 및 숙주 세포와; 이들 하이브리도마, 형질전환된 B 세포주, 및 숙주 세포의 자손 또는 유도체와; 등가의 또는 유사한 하이브리도마, 형질전환된 B 세포주, 및 숙주 세포가 또한 본 발명에 포함된다. 이들의 자손 또는 유도체는 예를 들어 모 주(parental line)에 의해 생산되는 항체의 아이소타입 및 항원 특이성과 같은 확인 특성들 중 하나 이상을 갖는 항체를 생산할 수 있다.

[0084] 본 발명은 본 발명의 단클론 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 단리된 폴리뉴클레오타이드 분자를 추가로 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 단클론 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 대하여 서열 동일성이 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 단리된 폴리뉴클레오타이드 분자에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 높은 엄격성 하에서 본 발명의 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 혼성화되는 폴리뉴클레오타이드, 또는 그의 상보체를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "엄격한 조건"은 65°C에서 0.5 M NaHPO₄, 7% 소듐 도데실 설페이트(SDS), 및 1 mM EDTA에서, 이어서 42°C에서 0.2 X SSC/0.1% SDS에서의 세척에서 제1 폴리뉴클레오타이드 분자가 필터-결합된 제2 폴리뉴클레오타이드 분자에 혼성화되어 그에 결합된 채 남아있는 능력을 말한다 (문헌[Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., NY, at p. 2.10.3 (1989)] 참조). 본 발명의 단클론 항체의 하나 이상의 CDR 영역 또는 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 본 발명에 또한 포함된다. 번역글로불린 가변 도메인 및 불변 영역을 클로닝 및 서열결정하는 일반적인 기술은 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Orlandi et al., 1989, PNAS USA; 86:3833]을 참조하라.

[0085] 또한, 본 발명은 본 발명의 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제조합 벡터를 포함한다. 벡터는 예를 들어 플라스미드, 바이러스 입자 또는 파지의 형태일 수 있다. 적절한 DNA 서열이 다양한 절차에 의해 벡터 내로 삽입될 수 있다. 일반적으로, DNA 서열은 당업계에 공지된 절차에 의해 벡터 내의 적절한 제한 엔도뉴클레아제 부위(들) 내로 삽입된다. 그러한 절차는 당업자의 범주 이내인 것으로 생각된다. 많은 수의 적합한 벡터 및 프로모터가 당업자에게 공지되어 있으며, 구매가능하다. 하기 벡터가 예로서 제공된다. 박테리아 벡터는 예를 들어 pQE70, pQE60, pQE-9, pBS, pD10, 파지스크립트(phagescript), psiX174, 피블루스크립트(pbluescript) SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, 및 pRIT5를 포함한다. 진핵 벡터는 예를 들어 pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG, pSVK3, pBPV, pMSG, 및 pSVL을 포함한다. 그러나, 임의의 다른 플라스미드 또는 벡터가 사용될 수 있다.

[0086] 본 발명의 몇몇 실시 형태는 상기에 기재된 벡터를 포함하는 숙주 세포를 또한 포함한다. 숙주 세포는 보다 고등한 진핵 세포, 예를 들어 포유류 또는 곤충 세포, 또는 보다 저등한 진핵 세포, 예를 들어 효모 세포일 수 있다. 또는, 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어 박테리아 세포, 또는 식물 세포일 수 있다. 벡터 제작물의 숙주 세포 내로의 도입은 예를 들어 인산칼슘 트랜스펙션, DEAE-텍스트란 매개된 트랜스펙션, 또는 전기천공과 같은 임의의 적합한 방법에 의해 행해질 수 있다 (문헌[Davis, L., et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986)]).

[0087] 본 발명의 단클론 항체는 적절한 프로모터의 제어 하에 포유류 세포, 효모, 박테리아, 또는 기타 세포에서 발현될 수 있다. 또한, 본 발명의 DNA 제작물로부터 유래되는 RNA를 이용하여 그러한 단백질을 생성하기 위하여 무세포 번역 시스템(Cell-free translation system)을 이용할 수 있다. 원핵 및 진핵 숙주에서 사용하기에 적절한 클로닝 및 발현 벡터는 문헌[Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989)]에 기재되어 있다.

[0088] 본 발명의 단클론 항체 유래의 하나 이상의 초가변 영역을 발현하는 파지 디스플레이 라이브러리, 및 그러한 파지 디스플레이 라이브러리로부터 얻어지는 클론이 또한 본 발명에 포함된다. 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 항체 유래된 분자들을 생성한다. 항체의 항원 결합 가변 도메인을 코딩하는 유전자 절편을 박테리오파지의 코트 단백질을 코딩하는 유전자에 융합시킨다. 그러한 유전자 융합물을 포함하는 박테리오파지를 이용하여 박테리아를 감염시키며, 생성된 파지 입자는 항체-융합 단백질을 발현하는 코트를 갖는데, 이때 항원 결합 도메인은 박테리오파지의 외부 상에서 디스플레이된다. 파지 디스플레이 라이브러리는, 예를 들어 미국 매사추

세즈주 이프스위치 소재의 뉴 잉글랜드 바이오랩스 인크.(New England Biolabs Inc.)로부터 입수가 가능한 Ph.D.TM-7 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리 키트(Phage Display Peptide Library Kit) (카탈로그 번호 E8100S) 또는 Ph.D.TM-12 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리 키트 (카탈로그 번호 E8110S)를 사용하여 제조될 수 있다. 또한, 문헌[Smith and Petrenko, 1997, Chem Rev; 97:391-410]을 참조하라.

[0089] 본 발명의 항체는 당업계에 잘 알려진 기술에 의해 기질 또는 탐지가능한 마커에 직접적으로 또는 간접적으로 커플링될 수 있다. 탐지가능한 마커는, 예를 들어 분광적 (예를 들어, u.v., i.r., 가시광, 라만(Raman), 표면 증강 라만 산란(surface enhanced Raman scattering, SERS), 질량 분광법), 광화학적, 생화학적, 면역화학적, 또는 화학적 수단에 의해 탐지가능한 에이전트(agent)이다. 유용한 탐지가능한 마커는 형광 염료, 화학발광 화합물, 방사성 동위원소, 고전자밀도 시약(electron-dense reagent), 효소, 착색된 입자, 바이오틴, 또는 다이옥시게닌을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 탐지가능한 마커는 흔히 측정가능한 시그널, 예를 들어, 방사능, 형광, 색상, 또는 효소 활성을 생성한다. 탐지가능한 에이전트에 콘주게이션된 항체는 진단 또는 치료 목적에 사용될 수 있다. 탐지가능한 에이전트의 예에는 다양한 효소, 자연 발생 포자-결부된 생체분자 (예를 들어, 다이피콜린산, 칼슘 다이피콜리네이트), 보결 분자단(prosthetic group), 형광 물질, 발광 물질, 생물 발광 물질, 방사성 물질, 다양한 양전자 방출 단층 촬영에 이용되는 양전자 방출 금속, 비방사성 상자성 금속 이온, 라만 표지 및 SERS 표지가 포함된다. 탐지가능한 물질은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 항체에 직접적으로, 또는 예를 들어 당업계에 공지된 링커와 같은 중간체를 통하여 간접적으로 커플링되거나 또는 콘주게이션될 수 있다. 예를 들어, 진단 용도로 금속 이온을 항체에 콘주게이션하는 것이 개시된 미국 특허 제4,741,900호를 참조하라. 적합한 효소의 예에는 서양 고추냉이 퍼옥시다아제, 알칼리 포스파타아제, 베타-갈락토시다아제, 및 아세틸콜린 에스테라아제가 포함되며; 적합한 보결 분자단 복합체의 예에는 스트렙타비딘/바이오틴 및 아비딘/바이오틴이 포함되며; 적합한 형광 물질의 예에는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 아이소티오시아네이트, 로다민, 다이클로로트라이아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 및 피코에리트린이 포함되며; 발광 물질의 예에는 루미놀이 포함되며; 생물 발광 물질의 예에는 루시페린 및 아에쿠오린이 포함되며; 적합한 방사성 물질의 예에는 요오드 (¹²¹I, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I), 탄소 (¹⁴C), 황 (³⁵S), 3중 수소 (³H), 인듐 (¹¹¹In, ¹¹²In, ¹¹³mIn, ¹¹⁵mIn), 테크네튬 (⁹⁹Tc, ^{99m}Tc), 탈륨 (²⁰¹Ti), 갈륨 (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), 팔라듐 (¹⁰³Pd), 몰리브덴 (⁹⁹Mo), 크세논 (¹³³Xe), 불소 (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, 및 ⁹⁷Ru가 포함된다. 그러한 모이어티(moiety)를 항체에 콘주게이션하는 기술은 잘 알려져 있다.

[0090] 본 발명의 항체는 공유결합에 의한 부착에 의해 임의의 유형의 분자가 항체에 콘주게이션되거나 개질된 항체의 유도체를 포함한다. 그러한 항체 유도체는, 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, 페길화, 인산화, 아마이드화, 공지된 보호/차단 기에 의한 유도체화, 단백질 분해에 의한 절단, 또는 세포 리간드 또는 기타 단백질에의 결합에 의해 개질된 항체를 포함한다. 다수의 화학적 개질 중 임의의 것이 튜니카마이신의 특정한 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 및 대사적 합성을 포함하지만 이에 한정되지 않는 공지된 기술에 의해 수행될 수 있다. 부가적으로, 당해 유도체는 하나 이상의 비-고전적 아미노산을 포함할 수 있다.

[0091] 본 발명의 항체는 본 명세서에 기재된 방법에 의해 그리고 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 면역특이적 결합에 대하여 분석될 수 있다. 사용될 수 있는 면역분석법은 BIAcore 분석법, 형광 활성화 세포 분류기 (fluorescence activated cell sorter, FACS) 분석법, 면역형광, 면역세포화학적 방법, 웨스턴 블롯(Western blot), 방사 면역 분석법, 효소 결합 면역흡착 분석법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), "샌드위치 (sandwich)" 면역분석법, 면역침전 분석법, 침강 반응(precipitin reaction), 젤 확산 침강 반응, 면역확산 분석법, 응집 분석법(agglutination assay), 보체 고정 분석법, 면역방사계수 측정법(immunoradiometric assay), 형광 면역 분석법, 및 단백질 A 면역분석법과 같은 기술을 사용한 경쟁적 및 비-경쟁적 분석 시스템을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 그러한 분석법은 통상적인 것이며 당업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어, 문헌 [Ausubel et al., eds, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994)] 참조).

[0092] 본 발명에서 개시되는 항체들 중 하나 이상을 함유하는 조성물이 본 발명에 또한 포함된다. 조성물은 또한 예를 들어 완충제를 함유하여 pH를 허용가능한 범위 내에서 유지하거나 또는 보존제를 함유하여 미생물 성장을 지연시킬 수 있다. 조성물은 예를 들어 담체, 부형제, 안정제, 킬레이트제, 염, 또는 항미생물제를 함유할 수 있다. 허용가능한 담체, 부형제, 안정제, 킬레이트제, 염, 보존제, 완충제, 또는 항미생물제는 인산염, 시트르산염, 및 기타 유기 산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 산화방지제; 보존제, 예를 들어 소듐 아자이드, 옥타데실다이메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈

에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤류, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔; 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 비-특이적 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 올리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는, 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; 킬레이팅제, 예를 들어 EDTA; 당, 예를 들어 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대 이온, 예를 들어 나트륨; 금속 복합체 (예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어 트윈, 플루로닉스(PLURONICS), 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 조성물은 다클론 항혈청이 아니다.

[0093] 또한, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 항체를 포함하는 키트 또는 탐지 시스템을 제공한다. 본 키트는 본 발명의 항체들 중 하나 이상으로 충전된 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다. 부가적으로, 본 키트는 완충액과 같은 기타 시약을 포함할 수 있으며, 본 발명을 실행하는 데 필요한 용액들이 또한 포함된다. 공지 사항 또는 인쇄된 사용 설명서가 그러한 용기(들)와 선택적으로 결부될 수 있다. 키트는 포장재를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 어구 "포장재"는 키트의 내용물을 수용하는 데 사용되는 하나 이상의 물리적 구조체를 말한다. 포장재는 잘 알려진 방법에 의해 제작되며, 이는 오염물질이 없는 살균 환경을 제공할 수 있다.

[0094] 본 발명은 단리된 항체를 포함한다. "단리된"은, 본 발명에서 개시되는 다양한 항체를 설명하기 위하여 사용될 때, 그의 자연적 환경의 구성요소로부터 확인 및 분리되고/되거나 회수된 항체를 의미한다. 그의 자연적 환경의 오염물질 성분은 전형적으로 폴리펩티드에 있어서의 진단 또는 치료적 사용을 방해하는 물질이며, 이는 효소, 호르몬, 및 기타 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다.

[0095] 본 발명의 항체는 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 상의 에피토프에 "특이적으로 결합"되거나 또는 "특이적"일 수 있다. 그러한 항체는 임의의 다른 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프에 사실상 결합되지 않고서 그 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 상의 에피토프에 결합되는 것이다.

[0096] 본 발명의 항체는 동물에 의해 생성되거나, 화학적으로 합성되거나 또는 재조합에 의해 발현될 수 있다. 본 발명의 항체는 면역글로불린 분자의 정제에 대하여 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들어 크로마토그래피 (이온 교환, 친화성, 및 크기별 분류 컬럼 크로마토그래피를 포함하지만, 이에 한정되지 않음), 원심분리, 차별적 용해도에 의해 또는 단백질 정제의 임의의 기타 표준 기술에 의해 정제될 수 있다. 게다가, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 정제 또는 탐지를 돕기 위하여 본 명세서에 기재되거나, 또는 달리 당업계에 공지된 실질적 폴리펩티드 서열에 융합될 수 있다.

[0097] 본 발명의 항체는 씨. 디피실레 포자, 및 그의 폴리펩티드 단편을 탐지하는 방법, 및 씨. 디피실레 포자, 또는 그의 폴리펩티드 단편을 단리 또는 정제하는 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는 매우 다양한 진단 및 치료 방법에서 사용될 수 있다.

[0098] 본 발명의 항체는 샘플 중 씨. 디피실레 포자의 존재 또는 부재를 결정하기 위하여 당업계에 공지된 매우 다양한 면역분석 기술들 중 임의의 것에서 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 면역분석법은 항체의 그의 항원 표적에 대한 반응을 이용하여 샘플 중 씨. 디피실레 포자와 같은 분석물의 존재를 확인하는 시험이다. 이 분석은 항체가 그의 항원에 특이적으로 결합하는 것을 이용한다. 그러한 탐지 방법이 본 발명에 또한 포함된다.

[0099] 면역분석법에서, 샘플이 하나 이상의 항체와 접촉되며, 항체가 그의 항원성 표적 - 샘플 중에 존재할 경우 - 에 결합되는 것이 허용된다. 이어서, 항체가 그의 항원 표적에 결합된 것을 탐지함으로써 하나 이상의 항체가 그의 항원성 표적에 결합하는 것을 결정한다. 그러한 탐지는 예를 들어 비색정량에 의해, 형광측정법에 의해 (fluorimetrically), 효소에 의해, 또는 방사성 동위원소를 이용하여 달성될 수 있다. 분석의 형태에 따라, 검출가능한 표지가 항원 또는 항체에 결합될 수 있다. 검출가능한 모이어티는 검출가능한 시그널을 직접적으로 또는 간접적으로 생성할 수 있어야 한다. 예를 들어, 검출가능한 모이어티는 예컨대 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , 또는 ^{125}I 와 같은 방사성 동위원소, 예를 들어 플루오레세인 아이소티오시아네이트, 로다민, 또는 루시페린과 같은 형광 또는 화학발광 화합물, 또는 예를 들어 알칼리 포스파타아제, 베타-갈락토시다아제 또는 서양 고추냉이 퍼옥시다아제와 같은 효소, 라만 표지, 또는 SERS 표지일 수 있다. 항체 또는 항원을 검출가능한 모이어티에 콘주게이션시키기 위한 당업계에 공지된 임의의 방법이 이용될 수 있다. 탐지가능한 모이어티 (본 명세서에서 탐지가능한 표지로도 지칭됨)는 "표지된" 항체를 생성하도록 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 콘주게이션될 수

있다. 표지는 자가 검출가능할 수 있거나 (예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소 표지의 경우, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매할 수 있다.

[0100] 본 발명의 면역분석법은 BIAcore 분석법, 형광 활성화 세포 분류기(FACS) 분석법, 면역형광, 면역세포화학적 방법, 웨스턴 블롯, 방사 면역 분석법, 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA), "샌드위치" 면역분석법, 면역침전 분석법, 침강 반응, 젤 확산 침강 반응, 면역확산 분석법, 응집 분석법, 보체 고정 분석법, 면역방사계수 측정법, 형광 면역 분석법, 및 단백질 A 면역분석법과 같은 기술을 사용한 경쟁적 및 비-경쟁적 분석 시스템을 포함하지 만, 이에 한정되지 않는다. 그러한 분석법은 통상적인 것이며 당업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어, 문헌 [Ausubel et al., eds, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994)] 참조).

[0101] 본 발명의 면역분석법은 동질적이거나 또는 이질적일 수 있다. 이질적 면역분석법은 일반적으로 고체상 시약을 사용하여 미결합 항체 또는 항원을 샘플로부터 제거하는 단계를 필요로 한다. 동질적 분석법은 이 단계를 필요로 하지 않기 때문에, 이는 전형적으로 실시가 보다 용이하며 보다 빠르다. 예를 들어, 분리 방법은 코팅된 튜브, 코팅된 비드, 코팅된 웰, 자기 입자 또는 유리 입자 상에서의 침전 (예를 들어, 제2 항체를 이용함) 및 제거를 포함한다.

[0102] 본 발명의 면역분석법은 예를 들어 경쟁적 결합 분석법일 수 있다. 경쟁적 면역분석법에서, 샘플 중 항원은 항체와 결합하기 위하여 표지 항원과 경쟁한다. 이어서 항체 부위에 결합된 표지된 항원의 양이 측정된다. 이 방법에서, 응답은 공지되지 않은 항원의 농도에 대하여 역비례할 것이다. 이는 응답이 클수록 샘플 중의 더욱 적은 항원이 표지 항원과의 경쟁에 이용가능하였기 때문이다. 경쟁적 면역분석법의 예로는 방사면역 분석법 (radioimmunoassay, RIA)이 있다.

[0103] 본 발명의 면역분석법은 예를 들어 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA)일 수 있다. ELISA에서, 공지되지 않은 양의 항원이 표면에 부착되며, 이어서 특이적 항체가 표면 위에서 세척되어 이것이 항원에 결합될 수 있도록 한다. 이 항체는 효소에 결합되며, 마지막 단계에서 효소를 몇몇 검출가능한 시그널로 전환시킬 수 있고 샘플 중 항원의 양을 측정할 수 있도록 하는 물질이 첨가된다. ELISA의 실시는 특정 항원에 대하여 특이성을 갖는 1종 이상의 항체를 포함한다. 공지되지 않은 양의 항원을 포함하는 샘플은 비-특이적으로 (표면에서의 흡착을 통하여) 또는 특이적으로 ("샌드위치" ELISA에서, 동일 항원에 대하여 특이적인 다른 항체에 의한 포획을 통하여) 고정 지지체 (예를 들어, 폴리스티렌 미세적정 플레이트) 상에 고정된다. 항원이 고정된 후, 탐지 항체가 첨가되어, 항원과 복합체를 형성한다. 탐지 항체는 효소에 공유결합에 의해 결합될 수 있거나, 또는 바이오콘쥬게이션(bioconjugation)을 통하여 효소에 결합되는 이차 항체에 의해 그 자체가 탐지될 수 있다. 각각의 단계 사이에 전형적으로 플레이트를 순한 세제 용액으로 세척하여 특이적으로 결합되지 않은 임의의 단백질 또는 항체를 제거한다. 최종 세척 단계 후, 플레이트를 효소 기질의 첨가에 의해 발색시켜 가시적 시그널을 생성하는데, 상기 시그널은 샘플 중 항원의 양을 나타낸다. ELISA에서는 발색, 발광, 또는 형광 기질이 이용될 수 있다.

[0104] 본 발명의 면역분석법은 샌드위치 분석법일 수 있다. 샌드위치 분석법에서, 분석물은 표적 분석물 상의 상이한 항원성 에피토프에 결합되는 2가지의 항체들 사이의 "샌드위치"이다. 하나의 항체는 포획 항체로서의 역할을 하며 제2 항체는 탐지 항체로서의 역할을 한다. 포획 항체는 고체상, 예를 들어 튜브 또는 웰에 코팅될 수 있으며, 탐지 항체는 탐지가능하게 표지될 수 있다.

[0105] 본 발명의 면역분석법은 예를 들어 면역크로마토그래피 측방 유동 분석법(immunochromatographic lateral flow assay) (본 명세서에서 측방 유동 분석법, 측방 유동 시험, 또는 면역크로마토그래피 스트립 시험으로도 지칭됨)일 수 있다. 측방 유동 분석법에서는 간단한 장치를 이용하여 샘플 중 표적 분석물의 존재 (또는 부재)를 신속하게 탐지한다. 이들 시험은 대개 자가 검사(home testing), 현장 검사(point of care testing), 또는 실험실 용도를 위한 의료 진단용으로 이용된다. 흔히 딥스틱(dipstick) 형태로 생성되기 때문에, 측방 유동 시험은 수성 용액 중에 현탁될 수 있는 시험 샘플이 흡수 패드를 향한 모세관 또는 위킹 작용을 통하여 다공성 기재 (예를 들어, 니트로셀룰로오스 막)를 유동하는 면역분석의 형태이다. 샘플을 기재에 적용한 후, 이것은 샘플과 혼합되는 착색된 시약 (예를 들어, 금 또는 라텍스 입자)과 조우하고 샘플 중에 존재할 경우 분석물에 결합한다. 이 혼합물은 분석물에 결합될 수 있는 항체가 고정되도록 전처리된 기질 조우 선 또는 구역(substrate encountering line or zone)을 통과한다. 분석물이 샘플 중에 존재할 경우, 착색된 시약은 시험 선 또는 구역에서 결합되게 될 수 있다. 대안적인 실시 형태에서, 측방 유동 분석법을 사용하여 샘플 중에 존재하는 특이적 항체를 검출할 수 있다. 그러한 실시 형태에서, 착색된 시약은 항원-코팅된 입자일 수 있으며,

검출 선 또는 구역은 항원으로 전처리될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,753,517호, 미국 특허 제6,485,982호, 미국 특허 제6,509,196호, 미국 특허 제7,189,522호, 및 미국 재발행 특허 제39664호, 미국 특허 출원 공개 제2006/0275920호, 및 문헌[Jeong et al., 2003, Korean J Biol Sci; 7:89-92]을 참조하라.

[0106] 본 명세서에 기재되는 하나 이상의 항체를 사용하여 샘플 중에 존재하는 경우 씨. 디피실레 포자를 기질에 결합시키고 이어서 포자의 존재를 임의의 다양한 수단에 의해 탐지 및/또는 정량화하는 검출 방법이 본 발명에 또한 포함된다. 포자의 존재는 예를 들어 현미경법, 배양, 효소 활성 항체 결합 (예를 들어, ELISA 분석법에서), 칼슘 분자 형광 또는 발광, 또는 란탄족 금속 매개된 발광에 의해 결정될 수 있다. 칼슘 이온과의 1:1 복합체 형태의 다이피콜린산은 박테리아 포자에 고농도로 존재하며, 임의의 기타 생명 형태에서는 관찰되지 않았다. 예를 들어, 테르븀 또는 유로퓸과 같은 란탄족 금속은 샘플 중 임의의 박테리아 포자에 존재하는 다이피콜린산(DPA)과 조합되어 예를 들어 테르븀 또는 유로퓸 다이피콜리네이트와 같은 란타네이트 킬레이트를 생성할 것이다. 그러한 란타네이트 킬레이트는 특유한 흡수 및 방출 스펙트럼을 가지며, 이들 스펙트럼은 광발광 시험을 이용하여 탐지될 수 있다. 란탄족 금속 매개된 발광이 본 명세서에 기재된 임의의 다양한 면역분석 방법에서, 예를 들어 측방 유동 분석법에서 탐지 시그널로서 또한 이용될 수 있다. 포자 발아시, Ca-DPA가 방출되고 칼슘이 다수의 수단에 의해 검출될 수 있다. 감지를 위하여 분자 형광 또는 발광을 사용하는 칼슘의 형광 측정에 의한 검출은 높은 민감성을 제공한다. 칼슘 지시 염료는 두 군으로 분류될 수 있는데, 즉 제1 군은 칼슘의 존재 하에 형광이 증가되는 염료인 반면, 제2 군은 칼슘의 존재 하에서의 여기 및/또는 방출 파장이 칼슘의 부재 하에서의 것과는 상이한 염료이다. 칼슘 지시 염료인 칼슘 그린-1, 칼슘 그린-2 및 플루오(Fluo)-4는 파장 변화 없이 칼슘 이온 (Ca^{2+})의 존재 하에서 형광이 증가되는 염료를 대표하는 것이다. 푸라(Fura)-2 및 인도(Indo)-1은 대부분의 실험에서 일반적으로 상호교환가능한 것으로 간주되는 비율계량형(ratiometric) Ca^{2+} 지시자이다. 푸라-2는 Ca^{2+} 에의 결합시 그의 흡수 또는 여기 피크가 338 nm로부터 366 nm로 이동하는 것을 나타낸다. 다른 한편으로, 인도-1은 칼슘의 존재 하에 485 nm로부터 405 nm로 방출이 이동한다. 칼슘은 또한 칼슘-활성화되는 광단백질, 예를 들어 아에쿠오린 및 오벨린을 사용하여 검출될 수 있다. 생물발광의 방출을 위하여 외부 조사에 의해 여기시킬 필요가 없기 때문에, 생성되는 시그널은 실질적으로 백그라운드(background)가 전혀 없다. 이는 극도로 낮은 수준의 검출 한계를 허용하여, 이들 광단백질이 분석 응용에 매력적인 표지가 되게 한다. 또한 칼슘 매개된 시그널링은 본 명세서에 기재된 임의의 다양한 면역분석 방법에서, 예를 들어 측방 유동 분석법에서 탐지 시그널로서 이용될 수 있다. 그러한 방법, 및 본 명세서에 기재된 기타 방법은 또한 샘플 중에 존재하는 포자의 정량화를 허용한다. 예를 들어, 미국 특허 제5,876,960호; 미국 특허 제6,498,041호; 미국 특허 제6,815,178호; 및 미국 특허 제7,306,942호, 미국 특허 출원 공개 제2003/0138876호; 미국 특허 출원 공개 제2004/0014154호; 및 미국 특허 출원 공개 제2005/0136508호와, 문헌[Ponce, 2003, NASA Tech Brief; 27(3):pp. i-ii, 1-3]을 참조하라.

[0107] 본 발명의 탐지 방법에서, 하나 이상의 항체가 사용될 수 있으며, 이는 씨. 디피실레 포자에 결합되는 본 발명에서 개시되는 항체들 중 하나 이상을 포함한다. 또한, 공지된 특이성의 하나 이상의 부가적인 항체가 사용될 수 있으며, 예를 들어 씨. 디피실레 영양 세포에 결합하거나, 예를 들어 씨. 클로스트리듐 또는 비. 서브틸리스와 같은 상이한 박테리아 종의 영양 세포에 결합하거나, 또는 예를 들어 씨. 클로스트리듐 또는 비. 서브틸리스의 포자와 같은 상이한 박테리아 종의 포자에 결합하는 하나 이상의 항체가 사용될 수 있다.

[0108] 샘플은 매우 다양한 공급원으로부터 얻어질 수 있으며, 이는 환경 또는 식품 샘플 및 의학적 또는 수의학적 샘플을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 환경 샘플의 예에는 물 샘플, 토양 샘플, 식물 샘플 및 공기 샘플이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 식품의 예에는 하기가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다: 고기류, 가금류, 난류(eggs), 생선, 해산물, 야채류, 과일류, 조리된 식품 (예를 들어, 수프, 소스, 페이스트), 곡물 가공품(grain products) (예를 들어, 곡분(flour), 시리얼, 빵), 통조림 식품, 밀크, 기타 유제품 (예를 들어, 치즈, 요구르트, 사워 크림), 지방, 오일, 디저트, 조미료, 향신료, 파스타, 음료, 물, 및 동물 사료. 의학적이거나 수의학적 샘플은 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 임상 샘플, 세포 용해물, 전혈 또는 그의 일부 (예를 들어, 혈청), 기타 체액 또는 체분비물 (예를 들어, 타액, 땀, 피지, 소변, 뇌척수액), 대변, 세포, 조직, 기관, 생검체, 및 상이한 유형의 스왑(swab).

[0109] 샘플은 감염 매개물(fomite)로부터 얻어질 수 있다. 용어 "감염 매개물"은 일반적으로 전염성 유기체를 운반하고/하거나 그를 옮길 수 있는 무생물 물체 또는 기체를 말하기 위하여 사용된다. 감염 매개물은 전염성 에이전트, 예를 들어 씨. 디피실레를 사람에서 사람으로 전달하는 역할을 한다. 감염 매개물은 천, mop 헤드(mop head), 수건, 스펀지, 와이프(wipe), 식기, 동전, 지폐, 핸드폰, (신발류를 포함하는) 의류, 문 손잡이, 여성용

제품, 기저귀 등, 이들의 일부, 및 이들의 조합을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 의학과 관련해서는 감염 매개물의 많은 예가 있으며; 사용 간에 적당하게 소독되지 않는 후두경과 같은 도구, 더러운 수건, 식기, 및 표면, 예를 들어 바닥, 벽, 및 테이블이 모두 병을 퍼지게 하는 역할을 할 수 있다. 관심 표면은 (문을 포함하는) 벽, 바닥, 천장, 배수구, 냉동 시스템, 덕트 (예를 들어, 통풍관), 통기구, 변좌, 핸들, 문 손잡이, 핸드레일(handrail), (예를 들어 병원에서의) 베드레일(bedrail), 조리대, 테이블톱(tabletop), 식사 표면(eating surface) (예를 들어, 트레이, 접시 등), 작업 표면, 장비 표면, 의류 등, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 표면의 적어도 일부를 포함할 수 있다.

[0110] 샘플은 액체, 고체 또는 반고체일 수 있다. 샘플은 고정 표면의 스왑일 수 있다. 샘플은 준비 또는 회석 없이 본 발명의 탐지 방법에서 직접적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 액체 샘플은 직접적으로 분석될 수 있다. 샘플은 완충 용액 또는 박테리아 배양용 배지를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는 용액 중에 회석 또는 현탁될 수 있다. 고체 또는 반고체인 샘플은 액체 중에 고체를 잘게 썰어 넣거나, 혼합하거나, 또는 불림으로써 액체 중에 현탁되어 있을 수 있다. 샘플은 추가로 농축되거나 풍부하게 될 수 있다.

[0111] 본 발명의 면역분석법은 다양한 적절한 대조 샘플을 포함할 수 있다. 예를 들어, 박테리아 포자, 세포 또는 독소를 전혀 포함하지 않는 음성 대조 샘플, 또는 박테리아 세포, 포자 또는 독소를 포함하는 양성 대조 샘플이 분석될 수 있다. 본 발명의 면역분석법은 전개에 몇 분만큼 적은 시간이 걸릴 수 있으며, 샘플 또는 시약 준비를 거의 또는 전혀 필요로 하지 않을 수 있다. 본 발명의 면역분석법은 정성적 또는 정량적 형태로 실시될 수 있다. 정성적 결과는 샘플에 있어서 단순한 양성 또는 음성 결과를 제공한다. 양성 및 음성 사이의 컷오프는 분석자에 의해 결정되며, 통계적일 수 있다. 표준 편차의 2배 또는 3배가 양성 샘플과 음성 샘플의 구별을 위하여 흔히 사용된다. 정량적 형태에서, 결과는 표준 곡선으로 내삽될 수 있는데, 이는 전형적으로 표적의 계단 회석(serial dilution)이다.

[0112] 본 발명은 하기 실시예에 의해 예시된다. 특정 예, 재료, 양, 및 절차는 본 명세서에서 설명되는 바와 같은 본 발명의 범주 및 사상에 따라 넓게 해석되어야 한다는 것을 이해하여야 한다.

[0113] [실시예]

[0114] 실시예 1

[0115] 씨. 디피실레 포자의 생성

[0116] 뇌 심장 주입 액체배지(Brain Heart Infusion Broth, BHI)의 하나의 튜브에 씨. 디피실레 (ATCC(등록상표) 번호 700792, 미국 버지니아주 머내서스 소재의 아메리칸 타입 컬렉션(American Type Culture Collection))을 접종하고, 이를 혐기성 조건 하에 35-37°C에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 이후, 액체배지 배양물의 1 밀리리터(㎖) 분취물을 BHI 액체배지를 포함하는 최소 4개의 튜브로 옮기고, 이어서 혐기성 조건 하에 35-37°C에서 12일 동안 인큐베이션하였다. 액체배지 배양물을 분당 10,000 회전수(rotations per minute, rpm)에서 10분 (min) 동안 원심분리하고, 세포 펠렛을 실온에서 1시간 동안 10 ㎖의 무수 에탄올에 재현탁시켜 영양 세포를 사멸시켰다. 1시간 후, 상기 현탁물을 10,000 RPM에서 10분 동안 원심분리시키고, 세포 펠렛을 살균 버터필드 완충액(Butterfield's buffer)으로 적어도 2회 세척하였다. 펠렛을 살균 버터필드 완충액에 재현탁시키고, 밀리리터당 포자수를 혐기성 혈액 한천 상의 연속 회석물의 도말에 의해 결정하였다. 재현탁된 포자를 불활성화 포자에 대한 다클론 항체의 생성에서의 면역원으로서 그리고 항-포자 항체의 결합 특이성을 결정하기 위한 ELISA 분석에서의 항원성 표적으로서 하기 실시예에서 사용하였다.

[0117] 실시예 2

[0118] 불활성화 씨. 디피실레 포자에 대한 다클론 항체의 생성

[0119] ㎖당 약 10^6 개의 포자의 농도의 씨. 디피실레 포자를 5% 포르말린으로 10분 동안 처리하여 포자를 불활성화시켰다. 불활성화된 포자를 살균 버터필드 완충액으로 2회 세척하고, 이어서 살균 버터필드 완충액에 재현탁시켰다. 다클론 항체를 불활성화 포자에 대하여 표준 프로토콜을 이용하여 토끼에서 생성하였다 (미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재의 안타진, 인크.(Antagene, Inc.)). 간략하게는, 뉴질랜드 화이트 토끼(New Zealand White rabbit) (2마리의 개별 토끼)를 면역화당 1×10^6 개/㎖ 당량의 불활성화 포자로 면역화하였다. 면역원을 살균 염수를 이용하여 1 ㎖이 되도록 희석시키고, 적절한 아쥬반트 1 ㎖과 조합하였다. 항원 및 아쥬반트를 혼합하여 안정한 에멀전을 형성하고, 이를 피하 주사하였다. 토끼를 1일에 완전 프로인트 아쥬반트(Complete Freund's Adjuvant, CFA) 중 항원으로 면역화하고, 이어서 20일, 40일, 및 60일에 불완전 프로인트

아주반트(Incomplete Freund's Adjuvant, IFA) 중 항원으로 면역화하였으며, 이는 모든 후속 주사를 위한 것이었다.

[0120] 마지막으로 면역화한지 10일 후, 혈액을 토끼로부터 수집하고, 37℃에서 하룻밤 응고시키고 철회하였다. 이어서 응고된 혈액을 24시간 동안 냉장시키고, 혈청을 가만히 따라내고, 2500 rpm에서 20분 동안 원심분리에 의해 투명해지도록 하였다. 면역이전(preimmune) 및 면역 혈청을 ELISA에 의해 불활성화 포자에 대하여 시험하였다. ELISA 프로토콜에 있어서, 씨. 디피실레의 불활성화 포자를 코팅 완충액 (살균 증류수 리터당 (0.1 M 중탄산염 완충액 1.59 그램(g)의 Na_2CO_3 및 2.93 g NaHCO_3 , pH 9.6) 중 밀리리터(ml)당 10^5 개의 포자가 되도록 희석시켰다. 100 마이크로리터(μl)의 포자 용액을 ELISA 플레이트 (ELISA 인헨스드 서피스 플레이트(Enhanced Surface plate), 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재의 비디 팔콘(BD Falcon))의 웰에 첨가하였다. 대조 웰에 100 μl 의 코팅 완충액을 첨가하였다. 플레이트를 파라필름(PARAFILM)으로 싸고, 4℃에서 15 내지 16시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 비우고, 세척 완충액 (0.05% 트윈(Tween) 20을 포함하는 인산염 완충 염수)으로 3회 세척하였다. 플레이트를 실온(RT)에서 진탕시키면서 2시간 동안 100 μl 의 차단 완충액 (PBS 중 1% BSA 및 0.05% 트윈-20)으로 차단시켰다. 플레이트를 비우고, 세척 완충액으로 3회 세척하고, 실온에서 진탕시키면서 1 내지 2시간 동안 차단 완충액 중 일차 항체 100 μl 를 이용하여 인큐베이션하였다. 플레이트를 비우고, 세척 완충액으로 3회 세척하고, 실온에서 진탕시키면서 1시간 동안 HRP 표지를 갖는 이차 항체 (염소 항-토끼 HRP 콘쥬게이트; 1:10,000의 희석, 미국 일리노이주 록포드 소재의 피어스(Pierce)) 100 μl 를 이용하여 인큐베이션하였다. 플레이트를 비우고, 세척 완충액으로 4회 세척하였다. 50 μl 의 기질 용액 (1-단계 울트라(Ultra) TMB, 미국 일리노이주 록포드 소재의 피어스)을 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 진탕시키면서 15 내지 30분 동안 인큐베이션하였다. 50 μl 의 중단 용액 (1.5 M 인산)을 첨가함으로써 색을 정지시키고, 각각의 플레이트의 흡광도를 스펙트라맥스 플러스(SpectraMax plus) 384 (미국 캘리포니아주 서니베일 소재의 몰레큘러 디바이시스(Molecular Devices))에서 450 nm에서 관독하였다. 흡광도들을 비교하여 표적에 있어서의 시그널의 증강 배수를 결정하였다. 면역화된 혈청은 불활성화 포자에 대하여 우수한 응답성을 나타내었으며, 이는 면역이전 혈청에서 얻어진 것의 대략 13배 내지 15배였다 (표 1).

표 1

불활성화 씨. 디피실레 포자에 대하여 생성된 항혈청의 특성화

450 nm에서의 흡광도*				
항체 희석비	토끼 #1		토끼 #2	
	면역이전 혈청	항혈청	면역이전 혈청	항혈청
1:1000	0.07	1.73	0.04	1.92
1:10,000	0.06	1.22	0.07	1.27
1:100,000	0.06	0.78	0.06	0.82

*면역이전 및 항혈청에서의 무항원 대조군의 평균 관독치는 450 nm에서 0.12 임

[0121]

[0122] 항체를 황산암모늄 침전, 이어서 단백질 A 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 간략하게는, 빙냉 포화 황산암모늄을 1:1의 최종 비가 되도록 (50% 포화 황산암모늄) 적가함으로써 항혈청을 침전시켰다. 이 절차를 끊임없이 교반하면서 빙냉 비커에서 행하였다. 상청액을 50-ml 원심분리 튜브로 옮기고, 4℃에서 하룻밤 왕복동식 혼합기 상에 두었다. 현탁물을 2℃에서 10,000 × g에서 30분 동안 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, 펠렛을 동일 부피의 탈이온수에 재현탁시켰다. 재현탁된 단백질을 2 리터(L)의 PBS에 대하여 투석시켰다 (12,000-14,000 MW의 컷오프(cut-off) 투석 튜브류). 투석 완충액을 약 2시간 후, 그리고 다시 약 24시간 후 제거 및 교환하였다. 투석한지 약 48시간 후, 단백질 투석액을 제거하고 0.22 μm 필터로 여과시켰다.

[0123] IgG 분획을 제조자의 지시에 따라 바이오라드(BioRad) (미국 캘리포니아주 헤라클레스 소재)로부터의 단백질 A 친화성 컬럼을 사용하여 크로마토그래피에 의해 여과액으로부터 회수하였다. 간략하게는, 시마즈(Shimadzu) HPLC 시스템 (모델 SCL-10AVP, 미국 메릴랜드주 컬럼비아 소재의 시마즈 코퍼레이션, 시마즈 사이언티픽 인스트루먼트즈, 인크.(Shimadzu Corporation, Shimadzu Scientific Instruments, Inc.))을 모든 예비 크로마토그래피 런에 사용하였다. 항체의 결합 및 용출에 사용한 용매는 하기에 열거되어 있으며, 이는 결합 완충액 A (인산염 완충 염수, pH 7.3) 및 용출 완충액 B (20 mM 아세트산나트륨, 0.5 M NaCl, pH 3.5)였다. 모든 완충액은 밀리큐(MILLI Q) 여과 시스템 (미국 매사추세츠주 빌레리카 소재의 밀리포어 코퍼레이션(Millipore Corp.))을 사용

하여 탈이온수를 이용하여 제조하였으며, 0.22- μm (기공 크기) 막 필터를 통하여 여과하였다. 샘플 주입 이전에 결합 완충액 A를 이용하여 컬럼을 사전 평형화하였다. 항혈청 샘플을 T=0분에서 샘플 주입 루프를 통하여 컬럼 내로 수동으로 주입하였다. 샘플 주입 후, 용매를 하기와 같이 컬럼에 관통시켰다. 0.6 ml/min의 유량으로 T=0분에서 출발하는 결합 완충액 B; 1.0 ml/min의 유량으로 T=20분에서 출발하는 용출 완충액 B; 및 1.0 ml/min의 유량으로 T=60분에서 출발하는 결합 완충액 B. 이동상 용매들 각각으로부터의 컬럼 용출액 분획들을 수집하였다. 정제된 항-씨. 디피실레 항체 단백질은 대략 51분에서 용출되었다. 각각의 런은 70분만큼 길었으며, 그 후 제2 피크를 완충액의 3회 교환 동안 투석물 내에 넣어 pH를 변화시켰다. 이어서 분획들을 여과하고, 폴딩하고, OD를 측정하였다. 20분에서 상기 완충액을 용출 완충액으로 바꾸었다. 정제한 항체를 4°C에서 완충액을 3회 교환하면서 PBS에 대하여 투석시켰다. 투석된 항체를 센트리콘(Centricon) 필터 (10,000의 분자량의 컷오프; 미국 매사추세츠주 빌레리카 소재의 밀리포어 코포레이션)를 사용하여 농축시켰다.

[0124] 정제한 항체를 ELISA에 의해 씨. 디피실레, 씨. 스포로게네스 (ATCC 3584) 및 비. 서브틸리스 (ATCC 19659) 포자에 대하여 시험하였다. 씨. 스포로게네스 및 비. 서브틸리스 포자를 프레스크 아일 컬처스(Presque Isle Cultures) (미국 펜실베이니아주 이리 소재)로부터 획득하였다. 포자들을 코팅 완충액 중에 희석시켰다. 비. 서브틸리스, 씨. 스포로게네스 및 씨. 디피실레의 다양한 수준의 포자 (10^3 내지 10^5 개/ml)를 코팅하고, 상기에 기재된 바와 같이 실시하는 ELISA 분석에서 항체를 이용하여 시험하였다. 항원 항체 상호작용을 항-토끼 HRP 항체 (미국 일리노이주 록포드 소재의 피어스)를 사용하여 탐지하였으며, 포자 항체는 ml당 10^5 개의 포자의 백그라운드에 비하여 응답성이 약 20배인 씨. 디피실레 포자와의 우수한 반응성을 나타냈으며, 씨. 스포로게네스와는 약 2배의 약한 반응성을 나타냈으며, 비. 서브틸리스 포자와는 백그라운드에 비하여 반응성을 전혀 나타내지 않았다 (표 2 참조). 표 2에 제시된 데이터는 실험 중 하나로부터의, 3개의 웰로부터의 판독치의 평균이며, 적어도 3회의 별도의 실험을 나타내는 것이다.

표 2

정제된 토끼 씨. 디피실레 포자 항체의 특성화

450 nm에서의 흡광도			
포자/ml	비. 서브틸리스	씨. 스포로게네스	씨. 디피실레
1.00E+03	0.21	0.24	0.17
1.00E+04	0.16	0.25	0.8
1.00E+05	0.16	0.41	4.13
무항원 대조군	0.17	0.17	0.17

[0125]

[0126] 실시예 3

[0127] 항체의 생성을 위한 씨. 디피실레 포자-특이적 단백질의 선택

[0128] 씨. 디피실레 균주 630의 전 게놈 서열이 결정되었으며, 미국 국립 생물 공학 정보 센터(NCBI), 미국 국립 의학 도서관(NLM), 미국 국립 보건원(NIH)에 의해 유지되는 젠뱅크(등록상표) 서열 데이터베이스에서 이용가능하다. 또한, 문헌[Sebaihia et al., 2006, Nat. Genet; 38 (7):779-786]을 참조하라. 씨. 디피실레에 대한 모든 젠뱅크(등록상표) 엔트리의 철저한 서치를 하였으며, 2가지의 포자 특이적 단백질을 항체 생성을 위하여 골랐다. 선택한 단백질들 중 하나는 가상 단백질 CD1021 (YP_001087502)이었으며, 이는 포자 코트 조립 단백질 H (cot H)에 대하여 보존된 도메인 (아미노산 잔기 90 내지 393)을 보여주는 것이다. 선택된 다른 단백질은 세포 표면 단백질 (추정 N-아세틸글루탐산-L-알라닌 아미다아제, YP_001087517)이었으며, 이는 보존된 도메인 CW_binding_2 (추정 세포벽 결합 반복 2; 174 내지 265, 275 내지 368, 381 내지 461) 및 아미다아제_3 (N-아세틸글루탐산-L-알라닌 아미다아제, 493 내지 673)을 갖는다. 이 분석은 NCBI로부터 이용가능한 그리고 www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml에서 이용가능한 보존 도메인 서치 툴을 사용하여 실시하였다.

[0129] 씨. 디피실레 630의 가상 단백질 CD1021 (젠뱅크 등록 번호 YP_001087502)은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

[0130] mdkkkftlli simivflcav ggvystssnk svdlysdvyi ekyfnrdkvm evnieidesd lkdmnenaik eefkvakvtv dgdytgnvgi
rtkgnsslis vandsdrys ykinfdkynt sqsmegltql nlncysdps ymrefltysi ceemglatpe fayakvsing eyhgylave
glkesylenn fgnvtgdlyk sdegsslyqk gddpesysnl ivesdkktad wskitkllks ldtgedieky ldvdsvlkni aintallnld

syqgsfahny ylyeqdgvfs mlpwdfnmsf ggfsgfgggs qsiaideptt gnledrplis sllknetykt kyhkyleeiv tkyldsdyle nmttklhdm i asyvkedpta ftyeefekn itssiedssd nkgfgnkgfd nnsnsnsds nnsnsenkr s gnqsdekevn aeltssvka ntdnetknkt tndsesknnt dkdksngdnn qklegpmgkg gksipgvlev aedmsktiks qlsgetsstk qnsgdesssg ikgsekfded msgmpeppeg mdgkmpgmg nmdkgdmngk ngnmmdrnq dnpreaggfg nrgggsvskt ttyfklilgg asmiimsiml vgvsvkr rrr fiksk (서열 번호 1). 또한, 문헌[Sebahia et al., 2006, Nat. Genet; 38 (7):779-786] 및 www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=126698605를 참조하라.

[0131] 씨. 디피실레 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 세포 표면 단백질 (젠뱅크 등록 번호 YP_001087517)은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

MLSKEINMRR NTKLLTTGIL SMAIVAPTMA FATESNAMEN NADLNINLEK
KSIVLGSKSK VSVKFKEKPD ADSIKLKYKC YDMLNNTTLN YNQSTGAYEG
IINYNKDPEY LNVWELQGIT INSKTNPKTL NRQDLEKMGL NLKDYNVTQE
CIIEDITSRK DVNKYLKRTS SPITELTGSD RYETAVKISK EGWKNGSDKV
VIINGDVSID GIISTPLATT YNAPILLVEK NNVPNSVKSE LKRLNPKDII
IIGDENAISK TTANQIKSTV NASQTRLNGS NRYETSLLIA KEIDKNHDVE
KVYITNANGG EVDALTIAAK AGQDKQPIIL TDKDSITDNT YKWLKSEDLQ
NAYFIGGPQM ISTNVINKVN GITKDSVTNN RVYGADRHET NANVIKKFYT
DDELEAVLVA KSDVLVDALA AGPLAANLKS PILITPKTYV SAYHKDNLEA
KSANKVYKIG GGLTSKVMSS IASSLSKHNT TPTEPGNSGG KTVMIDPGHG
GSAPGNSSGG MIEKDYNLNT SLATTEYLRS KGFNVIMTRD TDKTSLGNGR
TALSNSLKPDLFTSIHYNGS TNKQGHGVEV FYKLKDKNGG TTKTVATNIL
NRILEKFKLT NRGIKTRVLP SDSTKDYLYV LRSNDMPAVL VECAFLDNEN
DMSLINSSAK VKEMGTQIGK GIEDSLK (서열 번호 5).

[0132]

[0133] 또한, 문헌[Sebahia et al., 2006, Nat. Genet; 38 (7):779-786] 및 www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id를 참조하라.

[0134] 실시예 4

[0135] 가상 단백질 CD1021에 대한 GAT 다클론 항체

[0136] 가상 단백질 CD1021에 대한 다클론 항체를 스트래티직 다이아그노스틱스 인크.(Strategic Diagnostics Inc., SDI) (덴마크 네와르크 소재)의 독점적 게노믹 안티바디 테크놀로지(Genomic Antibody Technology)TM (GAT)를 사용하여 생성하였다. 당해 단백질 유래의 유일무이한 아미노산 서열을 확인하였으며, 이 서열 정보를 SDI의 독점적 플라스미드 벡터 내에 두었다. 벡터를 생쥐 내에 도입하였다. 이 기술을 이용하면 숙주 동물의 세포는 상기 플라스미드를 흡수한다. 이들 세포에서, 면역원이 숙주 세포에 의해 합성 및 분비되고, 면역 시스템에 의해 즉각적으로 인식되어, 발현된 단백질 서열에 대한 다클론 항체가 생성된다. 다클론 및 단클론 항체 둘 모두를 GAT를 이용하여 발생시킬 수 있다. 당해 단백질 면역원을 천연 단백질 합성 기구를 이용하여 숙주 동물에서 생성시킨다. 면역원을 실험실에서 합성 및 정제하지 않기 때문에, 이것은 변성 또는 열화될 기회가 없다. 천연 면역원은 면역계에 즉각적으로 제시되며, 이는 성숙 항체 반응으로 이어진다.

[0137] 다클론 항체 생성에 사용한 가상 단백질 CD1021의 단백질 서열은 잔기 505 내지 604였으며 하기 아미노산 서열을 가졌다: SKTIKSQLSG ETSSTKQNSG DESSSGIKGS EKFDDEMSGM PEPPEGMDGK MPPGMGNMDK GDMNGKNGNM NMDRNQDNPR EAGGFNGRGG GSVSKTTTYF

[0138] (서열 번호 2).

[0139] 2마리의 면역화된 생쥐 유래의 혈청을 폴링하고, 웨스턴 블롯에 의해 면역원에 대하여 시험하여 항체의 특이성을 결정하였다. 이후에, 실시예 2에 설명한 바와 같이 항체를 황산암모늄 침전, 이어서 단백질 A 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다.

[0140] 처음에, 비. 서브틸리스, 씨. 스포로게네스 및 씨. 디피실레의 다양한 수준의 포자 (10^3 내지 10^5 개/㎖)를 코팅

하고, 항체를 이용하여 시험하였다. 항원-항체 상호작용을 항-생쥐 HRP 항체 (미국 일리노이주 록포트 소재의 피어스)를 이용하여 탐지하였다. 가상 단백질 CD1021 (서열 번호 2)에 대한 생쥐 항체는 mL 당 10^5 개의 포자의 백그라운드에 비하여 약 10배 증가된 응답성을 나타냈으며, 씨. 스포로게네스 포자에서는 약한 응답 (약 2배)을 나타냈으며, 비. 서브틸리스 포자에서는 백그라운드에 비하여 반응을 전혀 나타내지 않았다 (표 3 참조). 표 3에 제시된 데이터는 3개의 웰의 판독치의 평균이며, 2회의 별도의 실험을 나타내는 것이다.

표 3

씨. 디피실레 가상 단백질 CD1021 생쥐 항체의 특성화

450 nm에서의 흡광도			
포자/ mL	비. 서브틸리스	씨. 스포로게네스	씨. 디피실레
1.00E+03	0.13	0.13	0.2
1.00E+04	0.15	0.17	0.2
1.00E+05	0.15	0.32	1.61
무항원 대조군	0.14	0.14	0.14

항체를 샌드위치 ELISA를 사용하여 추가로 시험하였다. 플레이트를 다클론 CD1021 항체로 코팅하고, 이어서 포자 (비. 서브틸리스, 씨. 스포로게네스 및 씨. 디피실레)를 결합시켰다. 제2 항체로서 상기 실시예 2로부터의 항-씨. 디피실레 불활성화 포자 항체, 이어서 항-토끼 HRP 항체 (비디 파밍젠(BD Pharmingen))를 이용하여 항체 항원 상호작용을 탐지하였다. 비. 서브틸리스, 씨. 스포로게네스, 및 씨. 디피실레의 포자를 다양한 수준으로 사용하였으며, 항체는 씨. 디피실레 포자의 탐지에 특이적이다. 그 결과를 하기 표 4에 나타낸다.

샌드위치 ELISA 프로토콜에서, 정제한 생쥐 CD1021 항체를 항원 코팅 완충액 중에 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 희석시켰다. $100 \mu\text{L}$ 의 항체 용액을 ELISA 플레이트 (ELISA 인헨스드 서피스 플레이트, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재의 비디 팔콘)의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 파라필름으로 싸고, 4°C 에서 15 내지 16시간 동안 인큐베이션 하였다. 플레이트를 비우고, 세척 완충액으로 4회 세척하였다. 플레이트를 실온(RT)에서 진탕시키면서 $100 \mu\text{L}$ 의 차단 완충액으로 2시간 동안 차단시켰다. 플레이트를 비우고, 세척 완충액으로 4회 세척하고, 차단 완충액 중 씨. 디피실레, 씨. 스포로게네스, 및 비. 서브틸리스 (mL 당 10^3 , 10^4 , 및 10^5 개의 포자 $100 \mu\text{L}$)의 포자 용액을 첨가하였다. 대조 웰의 경우, $100 \mu\text{L}$ 의 차단 완충액을 첨가하였다. 실온에서 2시간 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 비우고, 세척 완충액으로 4회 세척하고, 차단 완충액 중 이차 항체 (항-토끼 씨. 디피실레 포자 항체, 실시예 2에 기재되어 있음)를 이용하여 실온에서 진탕시키면서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 비우고, 세척 완충액으로 4회 세척하고, 실온에서 진탕시키면서 1시간 동안 HRP 표지를 갖는 이차 항체 (염소 항-토끼 HRP 콘쥬게이트; 1:10,000의 희석, 비디 파밍젠) $100 \mu\text{L}$ 를 이용하여 인큐베이션하였다. 플레이트를 비우고, 세척 완충액으로 3회 세척하였다. $50 \mu\text{L}$ 의 기질 용액 (1-단계 울트라 TMB, 피어스)을 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 진탕시키면서 15 내지 30분 동안 인큐베이션하였다. $50 \mu\text{L}$ 의 중단 용액 (1.5 M 인산)을 첨가함으로써 색을 정지시키고, 각각의 플레이트의 흡광도를 450 nm 에서 판독하였다. 흡광도들을 대조에 대하여 비교하여 표적에 있어서의 시그널의 증강 배수를 결정하였다 (표 4 참조). 표 4에 제시된 데이터는 3개의 웰의 판독치의 평균이며, 2회의 별도의 실험을 나타내는 것이다.

표 4

포자 항체를 이용한 샌드위치 ELISA에 의한 씨. 디피실레 가상 단백질 CD1021 생쥐 항체의 특성화

대조군과 비교한 변화 배수*			
포자/ mL	비. 서브틸리스	씨. 스포로게네스	씨. 디피실레
1.00E+03	1.1	1.03	1.22
1.00E+04	1.12	1.08	1.4
1.00E+05	1.14	1.04	2.35

*무항원 대조군 판독치는 450 nm 에서 1.05 임

실시예 5

[0146] 가상 단백질 CD1021 펩티드에 대한 다클론 항체

[0147] 2개의 유일무이한 아미노산 서열을 가상 단백질 CD1021로부터 확인하였다. 단백질 및 DNA 데이터베이스 둘 모두에서의 서치에 의하면, 둘 모두의 서열은 씨. 디피실레에 특이적이며, 바실루스와 같은 기타 박테리아와의 상동성은 전혀 없음이 밝혀졌다. 이들 두 서열은 하기와 같다:

[0148] 펩티드 1 EGSSLQYKGDDPESY (서열 번호 3)

[0149] (CD1021의 잔기 203 내지 217)

[0150] 펩티드 2 LKNETYKTKYHKYLE (서열 번호 4)

[0151] (CD1021의 잔기 333 내지 347).

[0152] 당해 펩티드들을 N-말단의 자유 시스테인을 이용하여 합성하고, 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH)에 콘주게이션시켜 높은 역가의 항체를 유도해 내었다. 에피토크스(Epitomics) (미국 캘리포니아주 벌링게임 소재)에 의한 항원 이용 표준 프로토콜에 따라 2마리의 개별 토끼를 면역화하기 위하여 2개의 KLH 콘주게이션된 펩티드 각각을 사용하였다. 간략하게는, CFA 1 ml을 포함하는 KLH-콘주게이션된 펩티드 (0.5 mg/ml)를 일차 주사하고, 이어서 IFA 1 ml을 포함하는 KLH-콘주게이션된 펩티드 (0.25 mg/ml)를 4회 부스팅하였다.

[0153] 각각의 면역화 후 혈액을 수집하고, 각각의 펩티드를 이용하여 ELISA에 의해 혈청을 시험하였다. 혈액 3 및 4는 상기 펩티드들에 대하여 우수한 응답성을 나타냈으며, 이는 면역이전 혈청에 비하여 대략 5 내지 7배의 응답성을 나타내었다 (표 5).

표 5

씨. 디피실레 CD1021 펩티드 혈청 (혈액 3)의 특성화

450 nm에서의 흡광도*							
항체 희석비	펩티드 1				펩티드 2		
	토끼 #1		토끼 #2		토끼 #1		토끼 #2
	면역이전 혈청	항혈청	면역이전 혈청	항혈청	면역이전 혈청	항혈청	면역이전 혈청
1:1000	0.18	1.72	0.20	1.62	0.200	1.82	0.20
1:10,000	0.15	1.21	0.15	1.12	0.120	1.18	0.14
1:100,000	0.10	0.68	0.08	0.72	0.070	0.64	0.08

* 면역이전 및 항혈청에서의 무항원 대조군의 평균 판독치는 450 nm에서 0.15 임

[0154]

[0155] 혈액 3 및 4 유래의 혈청을 황산암모늄 침전, 이어서 단백질 A 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였으며, 이는 실시예 2에 기재된 바와 같다. 정제한 항체를 플레이트 결합 펩티드에 대한 결합성에 대하여 ELISA에 의해 시험하였다.

[0156] 당해 펩티드들을 항원 코팅 완충액 중에 1 µg/ml 농도로 희석시켰다. 100 µl의 펩티드 용액을 ELISA 플레이트 (ELISA 인헨스드 서피스 플레이트, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재의 비디 팔콘)의 웰에 첨가하였다. 대조 웰에 100 µl의 코팅 완충액을 첨가하였다. 플레이트를 파라필름으로 싸고, 4°C에서 15 내지 16시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 비우고, 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 플레이트를 실온(RT)에서 진탕시키면서 100 µl의 차단 완충액으로 2시간 동안 차단시켰다. 플레이트를 비우고, 세척 완충액으로 3회 세척하고, 실온에서 진탕시키면서 1 내지 2시간 동안 차단 완충액 중 일차 항체 100 µl를 이용하여 인큐베이션하였다. 플레이트를 비우고, 세척 완충액으로 3회 세척하고, 실온에서 진탕시키면서 1시간 동안 HRP 표지를 갖는 이차 항체 (1:10,000의 희석) 100 µl를 이용하여 인큐베이션하였다. 플레이트를 비우고, 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 50 µl의 기질 용액 (1-단계 울트라 TMB, 피어스)을 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 진탕시키면서 15 내지 30분 동안 인큐베이션하였다. 50 µl의 중단 용액 (1.5 M 인산)을 첨가함으로써 색을 정지시키고, 각각의 플레이트의 흡광도를 450 nm에서 판독하였다. 흡광도들을 대조에 대하여 비교하여 표적에 있어서의 시그널의 증강 배수를 결정하였다.

[0157] 비. 서브틸리스, 씨. 스포로케네스 및 씨. 디피실레의 다양한 수준의 포자 (10^3 내지 10^5 개/ml)를 코팅하고, 항체를 이용하여 시험하였다. 항원 항체 상호작용을 항-토끼 HRP 항체 (미국 일리노이주 록포트 소재의 피어스)를 사용하여 탐지하였으며, 항체는 씨. 디피실레 포자의 검출에 특이적이었는데, 이는 백그라운드에 비하여 씨.

디피실레 포자에서 6 내지 10배의 응답성을 보여주었다. 표 6에 제시된 데이터는 3개의 웰의 판독치의 평균이며, 적어도 3회의 별도의 실험을 나타내는 것이다.

표 6

씨. 디피실레 가상 단백질 CD1021의 캡티드 서열에 대한 토끼 항체의 특성화

450 nm에서의 흡광도						
포자/ml	캡티드 1 Ab			캡티드 2 Ab		
	비. 서브틸리스	씨. 스포로게네스	씨. 디피실레	비. 서브틸리스	씨. 스포로게네스	씨. 디피실레
1.00E+03	0.15	0.14	0.2	0.14	0.14	0.21
1.00E+04	0.16	0.17	0.21	0.17	0.17	0.48
1.00E+05	0.16	0.29	1.53	0.16	0.27	0.95
무항원 대조군	0.22	0.22	0.22	0.2	0.2	0.2

[0158]

[0159] 실시예 6

[0160] 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 세포 표면 단백질에 대한 GAT 다클론 항체

[0161] 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 단백질인 세포 표면 단백질에 대한 다클론 항체를 스트래티직 다이아그노스틱스 인크. (덴마크 네와르크 소재)의 독점적 게노믹 안티바디 테크놀로지™ (GAT)를 사용하여 생성하였다. 단백질 유래의 유일무이한 서열을 확인하고, 면역원을 생체 내에서 생쥐에서 발현시켰으며, 이는 실시예 4에 기재된 바와 같다. 발현된 면역원은 숙주 면역계에 의해 인식되어, 발현된 단백질에 대한 다클론 항체가 생성되었다. 항체 생성에 사용한 세포 표면 단백질 (추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제)의 단백질 서열은 잔기 294 내지 393이었으며, 이는 DKNHDVEKV YITNANGGEV DALTIAAKAG QDKQPIILTD KDSITDNYKW LKSEDLQNAV FIGGPQMIST NVINKVNGIT KDSVTNNRVY GADRHETNAN (서열 번호 6)의 아미노산 서열을 갖는다.

[0162] 혈청을 면역화된 동물로부터 폴링하고, 웨스턴 블롯에 의해 면역원에 대하여 시험하여 항체의 특이성을 결정하였다. 이후에, 항체를 황산암모늄 침전, 이어서 단백질 A 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0163] 처음에, 비. 서브틸리스, 씨. 스포로게네스 및 씨. 디피실레의 다양한 수준의 미발아 포자 (10^3 내지 10^5 개/ml)를 코팅하고, 항체를 이용하여 시험하였다. 항원 항체 상호작용을 항-생쥐 HRP 항체 (미국 일리노이주 록포드 소재의 피어스)를 이용하여 탐지하였다. 세포 표면 단백질 (추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제)에 대한 항체는 씨. 디피실레 또는 기타 포자와의 반응을 전혀 나타내지 않았다.

[0164] 비. 서브틸리스, 씨. 스포로게네스 및 씨. 디피실레를 다양한 발아 유도 물질(germinant) 용액을 사용하여 발아시켰다. 발아된 포자 (10^3 내지 10^5 개/ml)를 코팅하고, 항체를 이용하여 시험하였다. 항원 항체 상호작용을 항-생쥐 HRP 항체 (미국 일리노이주 록포드 소재의 피어스)를 이용하여 탐지하였다. 항체는 발아된 씨. 디피실레 포자를 검출할 수 있었으며, 이는 백그라운드에 비하여 약 6배의 응답성을 보였지만, 발아된 비. 서브틸리스 또는 씨. 스포로게네스 포자는 검출할 수 없었다 (표 7 참조). 표 7에 제시된 데이터는 3개의 웰의 판독치의 평균이며, 2회의 별도의 실험을 나타내는 것이다.

[0165] 포자의 발아는 비. 서브틸리스 포자에서 잘 연구되었는데, 이는 아스파라긴 글루코스, 프룩토스 및 칼륨 이온의 조합물 ("AGFK") 및 L-알라닌을 포함하는 특정 발아 유도 물질에 의해 발아가 유도될 수 있다 (문헌[Moir and Smith, 1990, Ann Rev Microbiol; 44:531-553]). 씨. 디피실레 포자를 발아시키기 위한 처음 시도에서는 다양한 발아 유도 물질 (AGFK와 알라닌 및 이노신의 조합물)을 사용하였지만, 포자 발아가 효율적이지 못하였다. 씨. 디피실레 포자는 1% 소듐 타우로콜레이트가 첨가된 영양 배지에서 발아되며 (문헌[Sorg and Sonenshein, 2008, J Bacteriol (2008년 2월 1일자로 인쇄 전에 온라인 상에서 공개됨) doi:10.1128/JB.01765-07]), 상기 포자는 효모 추출물 (5 mg/ml), L-시스테인 (0.1%) 및 1% 소듐 타우로콜레이트로 보충된 뇌-심장 주입 액체배지에서 발아시켰다. 포자 배양물의 OD600의 측정 (OD600은 발아시에 감소됨) 및 위상차 현미경법이 포자의 발아 후에 이어졌다. 씨. 스포로게네스 및 비. 서브틸리스의 포자를 이전에 앞서 기재된 바에 따라 발아시켰다 (문헌[Broussolle et. al., 2002, Anaerobe; 8:89-100]; 문헌[Moir and Smith, 1990, Ann Rev Microbiol; 44, 531-553]).

표 7

씨. 디피실레 추정 아미다아제 생쥐 항체의 특성화

450 nm에서의 흡광도						
포자/ml	비. 서브틸리스		씨. 스포로게네스		씨. 디피실레	
	미발아	발아	미발아	발아	미발아	발아
1.00E+03	0.13	0.17	0.14	0.16	0.2	0.18
1.00E+04	0.12	0.2	0.13	0.22	0.2	0.39
1.00E+05	0.15	0.22	0.15	0.27	0.2	0.82
무항원 대조군	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13

[0166]

[0167] 실시예 7

[0168] 세포 표면 단백질 (추정 N-아세틸글루탐산-L-알라닌 아미다아제) 펩티드에 대한 다클론 항체

[0169] 2개의 유일무이한 서열을 씨. 디피실레 N-아세틸글루탐산-L-알라닌 아미다아제의 단백질 서열로부터 확인하였으며, 단백질 및 DNA 데이터베이스 둘 모두에서의 BLAST 서치시에 상기 서열들은 씨. 디피실레에 특이적이며, 바실루스와 같은 기타 박테리아와의 상동성은 전혀 없다.

[0170] 펩티드 1 YKLKDKNGGTTKTVA (서열 번호 7) (아미노산 잔기 582 내지 596)

[0171] 펩티드 2 KFKEKPDADSIKLY (서열 번호 8) (아미노산 잔기 64 내지 78)

[0172] 당해 펩티드들을 N-말단의 자유 시스템을 이용하여 합성하고, KLH에 콘쥬게이션시켜 높은 역가의 항체를 유도해 내었다. 둘 모두의 KLH 콘쥬게이션 펩티드를 조합하고 함께 사용하여 2마리의 개별 토끼를 면역화하였으며, 이는 안타진 (미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재)에 의한 표준 프로토콜에 따른 것이다. 마지막으로 면역화한 지 10일 후, 혈액을 토끼로부터 수집하고, 37°C에서 하룻밤 응고시키고 철회하였다. 이어서 응고된 혈액을 24 시간 동안 냉장시키고, 혈청을 가만히 따라내고, 2500 rpm에서 20분 동안 원심분리에 의해 투명해지도록 하였다. 상기 펩티드들에 대하여 면역화된 혈청 및 면역이전 혈청을 이용하여 처음 ELISA를 행하였다. 상기 펩티드들에 대하여 면역화된 혈청은 펩티드들에 대하여 우수한 응답성을 나타냈으며, 이는 면역이전 혈청에 비하여 약 7 내지 10배의 응답성을 보여주었다 (표 8).

표 8

씨. 디피실레 추정 아미다아제 펩티드 혈청의 특성화

450 nm에서의 흡광도*				
항체 희석비	토끼 #1		토끼 #2	
	면역이전 혈청	항혈청	면역이전 혈청	항혈청
1:1000	0.25	1.83	0.22	1.70
1:10,000	0.20	1.55	0.15	1.81
1:100,000	0.12	0.91	0.10	0.98

* 면역이전 및 항혈청에서의 무항원 대조군의 평균 판독치는 450 nm에서 0.20 임

[0173]

[0174] 항체를 황산암모늄 침전, 이어서 단백질 A 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였으며, 이는 실시예 2에 기재된 바와 같다. 정제한 항체를 ELISA에 의해 시험하였다. 처음에, 비. 서브틸리스, 씨. 스포로게네스 및 씨. 디피실레의 다양한 수준의 미발아 포자 (10^3 내지 10^5 개/ml)를 코팅하고, 항체를 이용하여 시험하였다. 항원 항체 상호작용을 항-토끼 HRP 항체 (미국 일리노이주 록포드 소재의 피어스)를 이용하여 탐지하였다. 세포 표면 단백질 (추정 N-아세틸글루탐산-L-알라닌 아미다아제)에 대한 항체는 씨. 디피실레 또는 기타 포자와의 반응을 전혀 나타내지 않았다. 비. 서브틸리스, 씨. 스포로게네스 및 씨. 디피실레를 다양한 발아 유도 물질 용액을 사용하여 발아시켰다. 발아된 포자 (10^3 내지 10^5 개/ml)를 코팅하고, 항체를 이용하여 시험하였다. 항원 항체 상호작용을 항-토끼 HRP 항체 (미국 일리노이주 록포드 소재의 피어스)를 이용하여 탐지하였다. 항체는 발아된 씨. 디피실레 포자를 검출할 수 있었으며, 이는 백그라운드에 비하여 약 6배의 응답성을 보였지만, 비. 서브틸리스 또는 씨. 스포로게네스 발아 포자는 검출할 수 없었다 (표 9 참조). 표 9에 제시된 데이터는 3개의 웰의

판독치의 평균이며, 2회의 별도의 실험을 나타내는 것이다.

표 9

씨. 디피실레 추정 아미다아제 토끼 항체의 특성화

450 nm에서의 흡광도						
포자/ml	비. 서브틸리스		씨. 스포로게네스		씨. 디피실레	
	미발아	발아	미발아	발아	미발아	발아
1.00E+03	0.13	0.18	0.14	0.17	0.2	0.18
1.00E+04	0.13	0.19	0.12	0.21	0.18	0.44
1.00E+05	0.14	0.22	0.15	0.26	0.19	0.93
무항원 대조군	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13

실시예 8

씨. 디피실레 포자의 검출을 위한, 씨. 디피실레 공통 항원에 대한 다클론 항체

구매가능한 토끼 씨. 디피실레 공통 항원 (글루타메이트 데하이드로게나아제) 항체 (미국 메인주 사코 소재의 메리디언 라이프 사이언스(Meridian Life Science))는 독소생성(toxigenic) 및 독소 비생성(nontoxigenic) 균주 둘 모두와 반응하며, 씨. 디피실레의 영양 세포의 탐지에 사용된다. 이 실시예에서, 구매가능한 토끼 씨. 디피실레 공통 항원 항체를 ELISA에 의한 씨. 디피실레 포자의 검출에 대하여 시험하였다. 항체를 황산암모늄 침전, 이어서 단백질 A 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 비. 서브틸리스, 씨. 스포로게네스 및 씨. 디피실레의 다양한 수준의 포자 (10^3 내지 10^5 개/ml)를 플레이트에 코팅하고, 항체를 이용하여 시험하였다. 항원 항체 상호작용을 항-토끼 HRP 항체 (미국 일리노이주 록포드 소재의 피어스)를 이용하여 탐지하였다. 공통 항원 항체는 씨. 디피실레 포자와는 우수한 반응성을 나타냈으며 (대략적으로 백그라운드에 비하여 10^4 개의 포자/ml에서는 10배의 응답성, 그리고 10^5 개의 포자/ml에서는 18배의 응답성), 씨. 스포로게네스 포자와는 약한 반응성을 나타냈으며 (백그라운드에 비하여 약 2배의 응답성), 비. 서브틸리스 포자와는 백그라운드에 비하여 반응성을 전혀 나타내지 않았다 (표 10 참조). 표 10에 제시된 데이터는 3개의 웰의 판독치의 평균이며, 적어도 3회의 별도의 실험을 나타내는 것이다. 이 항체를 샌드위치 ELISA 분석에서 포획 항체로 사용할 수 있다.

표 10

토끼 씨. 디피실레 공통 항원 항체의 특성화

450 nm에서의 흡광도			
포자/ml	비. 서브틸리스	씨. 스포로게네스	씨. 디피실레
1.00E+03	0.14	0.15	0.44
1.00E+04	0.15	0.15	2.13
1.00E+05	0.2	0.31	3.69
무항원 대조군	0.19	0.19	0.19

실시예 9

영양 세포에의 씨. 디피실레 항체의 결합

불활성화 포자에 대한 토끼 다클론 항체 (실시예 2에 보다 상세하게 설명됨), 서열 번호 3의 CD1021 서열에 대한 토끼 다클론 항체 (실시예 5에 보다 상세하게 설명됨), 서열 번호 7 및 서열 번호 8의 2개의 아미다아제 펩티드에 대한 토끼 다클론 항체 (실시예 7에 보다 상세하게 설명됨), 및 구매가능한 항-GDH 항체 (실시예 8에 보다 상세하게 설명됨)를 씨. 디피실레의 영양세포에의 결합에 대하여 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 씨. 디피실레 ATCC 균주 43594, 43596, 및 43603을 혐기성 조건 하에 티오글리콜레이트 배지에서 16 내지 18시간 동안 배양하였다. 세포를 항원 코팅 완충액 중에 연속적으로 희석시키고, 100 μ l의 다양한 희석물을 ELISA 플레이트에

첨가하고, 플레이트를 혐기성 조건 하에 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하여 포자 형성을 방지하였다. 플레이트를 비우고, 세척 완충액으로 3회 세척하고, 혐기성 조건 하에 37℃에서 1시간 동안 차단 완충액으로 차단하였다. 플레이트를 비우고, 세척 완충액으로 3회 세척하고, 실온에서 1시간 동안 일차 항체를 이용하여 인큐베이션하였다. 플레이트를 비우고, 세척 완충액으로 3회 세척하고, 실온에서 1시간 동안 HRP 표지를 갖는 이차 항체 (1:10,000)를 이용하여 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, 기질을 첨가하여 발색시키고, 플레이트를 중단 용액의 첨가 후 450 nm에서 판독하였다. 불활성화 포자, CD1021 (서열 번호 3) 및 아미다아제 (서열 번호 7 및 서열 번호 8)에 대한 토끼 다클론 항체는 영양 세포 (약 10^3 내지 10^7 개의 세포/ml)와의 결합을 전혀 나타내지 않았다. 그러나, 구매가능한 항-GDH 항체는 약 10^7 개의 세포/ml에서 우수한 결합을 나타냈으며, 대조군에 비하여 시그널이 4배 증강되었다 (표 11 참조). 표 11에 제시된 데이터는 3개의 웰의 판독치의 평균이며, 2회의 별도의 실험을 나타내는 것이다.

표 11

항체와 영양 세포의 결합

ATCC 43594						
450 nm에서의 흡광도						
항체	무항원 대조군	10^3 개의 세포/ml	10^4 개의 세포/ml	10^5 개의 세포/ml	10^6 개의 세포/ml	10^7 개의 세포/ml
포자 Ab	0.12	0.11	0.13	0.12	0.12	0.16
아미다아제 Ab	0.15	0.14	0.11	0.11	0.12	0.27
CD1021 펩티드 1 Ab	0.11	0.11	0.11	0.12	0.12	0.24
GDH Ab	0.12	0.11	0.10	0.14	0.35	0.85

ATCC 43596						
450 nm에서의 흡광도						
항체	무항원 대조군	10^3 개의 세포/ml	10^4 개의 세포/ml	10^5 개의 세포/ml	10^6 개의 세포/ml	10^7 개의 세포/ml
포자 Ab	0.12	0.12	0.12	0.11	0.11	0.14
아미다아제 Ab	0.15	0.11	0.11	0.11	0.12	0.22
CD1021 펩티드 1 Ab	0.11	0.11	0.12	0.11	0.13	0.21
GDH Ab	0.12	0.11	0.12	0.16	0.40	0.76

ATCC 43603						
450 nm에서의 흡광도						
항체	무항원 대조군	10^3 개의 세포/ml	10^4 개의 세포/ml	10^5 개의 세포/ml	10^6 개의 세포/ml	10^7 개의 세포/ml
포자 Ab	0.12	0.12	0.13	0.12	0.12	0.15
아미다아제 Ab	0.15	0.11	0.12	0.11	0.13	0.25
CD1021 펩티드 1 Ab	0.11	0.11	0.12	0.11	0.12	0.22
GDH Ab	0.12	0.09	0.10	0.14	0.43	0.80

[0183]

[0184] 실시예 10

[0185] 씨. 디피실레 포자 검출에 있어서 측방 유동 장치에서의 항체의 사용

[0186] 상기 실시예에서 설명한 다양한 항체를 Cy3 (Cy3 Ab 표지 키트, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 아머샴 바이오사이언시즈(Amersham Biosciences))으로 표지하고, 씨. 디피실레 포자를 검출하는 능력에 대하여 시험하였다. 구체적으로는, 불활성화 포자에 대한 토끼 다클론 항체 (실시예 2에 보다 상세하게 설명되고, 표 12에서 "포자" 항체로 지칭됨), 서열 번호 3의 CD1021 서열에 대한 토끼 다클론 항체 (실시예 5에 보다 상세하게 설명되고, 표 12에서 "CD1021 펩티드 1 Ab"로 지칭됨), 서열 번호 7 및 서열 번호 8의 두 아미다아제 펩티드의 믹스에 대한 토끼 다클론 항체 (실시예 7에 보다 상세하게 설명되고, 표 12에서 아미다아제 펩티드 Ab로 지칭됨), 및 씨. 디피실레 글루타메이트 데하이드로게나아제 공동 항원에 대한 구매가능한 토끼 항체 (실시예 8에 보다 상세하게 설명되고 표 12에서 "GDH" 항체로 지칭됨)를 표지하고, 시험하였다.

[0187] 흡수 패드, 니트로셀룰로오스 막, 및 콘쥬게이트 패드를 갖는 전형적인 측방 유동 스트립을 준비하였다. 항체

를 니트로셀룰로오스 상에 스포팅하고, 건조시켰다. 씨. 디피실레, 씨. 스포로게네스 및 비. 서브틸리스의 발아 및 미발아 포자 (10^5 개/ml)를 표지된 항체들 ($10 \mu\text{g/ml}$ 의 Cy3 표지 항체 $50 \mu\text{l}$) 각각과 개별적으로 혼합하고, 콘쥬게이트 패드에 적용하였다. 항체-포자 혼합물을 10분 동안 위킹시켰다 (wick). 인산염 완충 염수를 대조군으로 사용하였다. 10분 후, 스트립을 마이크로어레이 스캐너 (미국 노스캐롤라이나주 더럼 소재의 테칸(Tecan))를 사용하여 스캐닝하였다.

[0188] 씨. 디피실레 포자 항체, 아미다아제 항체, 또는 CD1021 항체를 사용하는 측방 유동 스트립은 이 항체들이 씨. 디피실레 포자의 검출에서 특이적임을 나타내었다. 아미다아제 항체는 미발아 포자를 검출하지 못하지만, 발아 포자는 검출할 수 있었다. 이들 관찰에 기초하면, 씨. 디피실레 포자를 검출하기 위한 측방 유동 스트립을 디자인할 수 있다. 예를 들어, 표지된 GDH 항체를 탐지 시약으로 사용하고 포자 항체 또는 CD1021 항체를 포획 시약으로 사용하여 미발아된 포자를 검출하고 아미다아제 항체를 포획 시약으로 사용하여 발아된 포자를 검출할 수 있다.

[0189] 표 12에 약술된 바와 같이, 항체의 다양한 쌍을 사용하여 씨. 디피실레 포자를 탐지하여, 포자 또는 발아된 포자를 검출할 수 있다.

표 12

씨. 디피실레 포자의 검출을 위한 항체 쌍

항체 1	항체 2	특이성
아미다아제 펩티드 Ab	GDH	씨. 디피실레 발아 포자
아미다아제 펩티드 Ab	CD1021 펩티드 1 Ab	씨. 디피실레 발아 포자
아미다아제 펩티드 Ab	포자	씨. 디피실레 발아 포자
CD1021 펩티드 1 Ab	GDH	씨. 디피실레 포자
CD1021 펩티드 1 Ab	아미다아제 펩티드 Ab	씨. 디피실레 발아 포자
CD1021 펩티드 1 Ab	포자	씨. 디피실레 포자
포자	GDH	씨. 디피실레 포자
포자	아미다아제 펩티드 Ab	씨. 디피실레 발아 포자
포자	CD1021 펩티드 1 Ab	씨. 디피실레 포자
포자	포자	씨. 디피실레 포자
CD1021 펩티드 1 Ab	CD1021 펩티드 1 Ab	씨. 디피실레 포자
아미다아제 펩티드 Ab	아미다아제 펩티드 Ab	씨. 디피실레 발아 포자

[0190]

[0191] 실시예 11

[0192] 표면 상에서의 씨. 디피실레 포자의 검출

[0193] 10^6 개/ml의 씨. 디피실레 포자 $100 \mu\text{l}$ 를 살균 알루미늄 쿠폰 ($2.54 \text{ cm} \times 7.62 \text{ cm}$ ($1" \times 3"$)) 상에 분포시키고, 실온에서 약 1시간 동안 건조시켰다. 약 $50 \mu\text{l}$ 의 살균 PBS로 습윤시킨 살균 스왑을 이용하여 5 내지 10초 동안 격렬하게 문지름으로써 포자를 회수하였다. 포자를 포함하는 스왑을 1 ml 의 코팅 완충액에 침지시키고, 1 내지 2분 동안 격렬하게 와동시켰다. 면봉을 상기 용액으로부터 꺼내고, 포자의 회수성을 ELISA에 의해 결정하였다. 대조군에 있어서는, 쿠폰에 살균 PBS를 분배하고, 유사하게 프로세싱하였다. 표 13에서 보는 바와 같이, 씨. 디피실레 포자 항체 및 CD1021 펩티드 1 Ab는 표면 상에서 포자의 존재를 탐지할 수 있었다.

표 13

알루미늄 쿠폰으로부터의 씨, 디피실레 포자의 검출

450 nm에서의 흡광도				
	씨, 디피실레		무항원 대조군	
	포자 Ab	CD1021 펩티드 1 Ab	포자 Ab	CD1021 Ab1
쿠폰 1	1.35	1.12	0.15	0.18
쿠폰 2	1.64	1.24	0.18	0.21
쿠폰 3	1.22	0.93	0.14	0.2

[0194]

[0195] 실시예 12

[0196] 항체의 항원 친화성에 의한 정제

[0197] 특정 항원에 대하여 특이적인 그리고 다른 면역글로불린 유래의 교차 반응물이 없는 항체의 정제가 흔히 유익하다. 상기 실시예에서 설명한 다클론 항체들 중 임의의 것은 NH₂ 결합을 통하여 친화성 매트릭스에 공유결합에 의해 결합된 펩티드 또는 단백질 항원을 사용하여 친화성 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있다. 정제는 컬럼 형태의 펩티드/단백질 결합 친화성 매트릭스, 예를 들어 아피젤(Affygel) (미국 캘리포니아주 헤라클레스 소재의 바이오라드) 또는 CNBr 활성화 세파로스 4B (미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 아머샴 바이오사이언시즈)를 사용하여 성취할 수 있다. 항원에 특이적인 항체는 컬럼에 결합된다. 미결합 항체 및 기타 혈청 단백질은 컬럼을 통과한다. 이어서 항원 결합 항체를 컬럼으로부터 용출시킨다. 생성된 정제 항체는 고도로 특이적이다.

[0198] 실시예 13

[0199] 씨, 디피실레 가상 단백질 CD1021의 부가적인 영역에 대한 항체

[0200] 실시예 4에 더욱 상세하게 설명한 절차에 따라, 씨, 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021의 부가적인 폴리펩티드 서열에 대하여 쥐과 다클론 및 단클론 항체를 개발할 수 있다. 예를 들어, KSVLYSDVY IEKYFNDRKV MEVNIEIDES DLKDMNENAI KEEFKVAKVT VGDYTYGNVG IRTKGNSSLI SVANSDDRY SYKINFDKYN T (서열 번호 9)의 아미노산 서열을 갖는 씨, 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021의 잔기 30 내지 120을 갖는 폴리펩티드, 또는 VTGDLYKSDE GSSLQYKGDD PESYSLNIVE SDKKTADWSK ITKLLKSLDT GEDIEKYLDV DSVLKNIAIN TALLNLDYSY GSAHNYLY EQDGVFMSLP (서열 번호 10)의 아미노산 서열을 갖는 씨, 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021의 잔기 194 내지 293을 갖는 폴리펩티드를 면역원으로서 사용할 수 있다. 예를 들어 서열 번호 9 및 서열 번호 10의 약 10-20개 아미노산 및 약 14개 아미노산의 단편을 포함하는 그의 단편에 대하여 다클론 및 단클론 항체를 개발할 수 있다.

[0201] 실시예 14

[0202] 단클론 항체

[0203] 씨, 디피실레 내세포자에 결합되는 단클론 항체를 다양한 공지된 방법에 의해 생성할 수 있다. 단클론 항체는 항원으로서 서열 번호 1-12, 16-23, 38, 및 45-50, 및 그의 단편 중 임의의 것을 사용하여 생성할 수 있다. 예를 들어, 실시예 4에 설명한 바와 같이 서열 번호 2의 가상 CD1021 단백질 서열, 또는 실시예 6에 설명한 바와 같이 서열 번호 6의 추정 아미다아제 단백질 서열로 면역화한 생쥐를 쥐과 단클론 항체의 생성에 사용할 수 있다. 또한, 실시예 5에 설명한 바와 같이 서열 번호 3 또는 서열 번호 4의 가상 CD1021 펩티드들, 또는 실시예 7에 설명한 바와 같이 서열 번호 7 또는 서열 번호 8의 추정 아미다아제 펩티드로 면역화한 토끼를 토끼 단클론 항체의 생성에 사용할 수 있다. 생쥐로 출발하는 통상적인 방법이라기보다는 오히려 토끼로부터 단클론 항체를 만드는 에피토크의 독점적 방법을 사용할 수 있다. 항체를 만드는 기본적인 원리는 생쥐 단클론과 동일하다. 토끼 B-세포에 융합되어 토끼 하이브리도마 세포를 생성할 수 있는 독점적 토끼 융합 파트너를 사용한다. 이어서 특이적으로 그리고 민감하게 항원 인식을 하는 클론에 대하여 하이브리도마를 스크리닝하여 선발하고, 다양한 방법을 사용하여 항체를 특성화한다.

[0204] 실시예 15

- [0205] Blast 분석
- [0206] 가상 단백질 CD1021 (YP_001087502) (서열 번호 1) 및 추정 N-아세틸류라모일-L-알라닌 아미다아제 세포 표면 단백질 (YP_001087517) (서열 번호 5)에 있어서의 씨. 디피실레 균주 630 단백질 서열을 젠뱅크, RefSeq 뉴클레오타이드(Nucleotides), EMBL, DDBJ, 및 PDB 서열 (HTGS0,1,2, EST, GSS, STS, PAT, WGS는 제외)에서 입수가능한 대략 988개의 미생물 게놈 서열에 대한 상동성에 대하여 서치하였다. 유의한 정렬 (0.0의 E 값)을 생성하는 서열들을 단지 씨. 디피실레 균주 630, 씨. 디피실레 QCD-66c26, 및 씨. 디피실레 QCD-32g58에 대한 게놈 서열 데이터베이스에서 찾아내었다.
- [0207] 씨. 디피실레 QCD-32g58에서의 가상 단백질 CD1021.
- [0208] 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021 (서열 번호 1)에 있어서 유의한 상동성 (0.0의 E 값)을 갖는 하기 서열을 씨. 디피실레 QCD-32g58에서 찾아내었다.
- [0209] 젠뱅크 등록 번호 ZP_01804840, 하기 아미노산 서열을 갖는 씨. 디피실레 QCD-32g58에서의 가상 단백질 CdifQ_04001048:
- [0210] MIIFLCVVG VYSTSSNKS DLYSDVYIEK YFNDRKVM EV NIEIDESDL DMNENAIKEE FKVAKVTVDG DTYGNVGIRT KGNSSLTSVA NSDSDRYSYK INFDKYNTSQ SMEGLTQLNL NNCYSDPSY REFLTYSICE EMGLATPEFA YAKVSINGEY HGLYLAVEGL KESYLENNFG NVTGDLYKSD EGSSLQYKGD DPESYSNLIV ESDKKTADWS KITKLLKSLD TGEDIEKYLD VDSVLKNIAI NTALLNLDSY QGSFAHNYLY EQDGVFSML PWDFNMSFGG FSGFGGGSQS IAIDEPTTGN LEDRPLISS LKK (서열 번호 11).
- [0211] 젠뱅크 등록 번호 ZP_01804841, 하기 아미노산 서열을 갖는 씨. 디피실레 QCD-32g58에서의 가상 단백질 CdifQ_04001049:
- [0212] MTTKLHDMIA SYVKEDPTAF YTYEEFEKNI TSSIEDSSDN KGFGNKGFDN NNSNNSDSNN NSNSENKRSQ NQSDKKEVNA ELTSSVVKTN TDNETENKTT NDSESKNNTD KDKSGNDNNQ KLEGPRGKGG KSIPGVLEVA EDMSKTIKSQ LSGETSSTKQ NSGDESSGI KGSEKFDEDM SGMPEPPEG M DGKMPPGMGN MDKGMNGKN GNMNMNRNDQ NPREGAGFGN RGGGSVSKTT TYFKLILGGA SMIIMSIMLV GVSVRKRRRF IKSQ (서열 번호 12). 젠뱅크 등록 번호 NZ_AAML04000007의 영역 461827 내지 462825; 하기 뉴클레오타이드 서열을 갖는 씨. 디피실레 QCD-32g58 C_디피실레_bld4_cont00007:
- [0213] AAGATAAAAA AATTTACCCT TCTTATCTCT ATTATGATTA TATTTTTATG TGCTGTAGTT GGAGTTTATA GTACATCTAG CAACAAAAGT GTTGATTTAT ATAGTGATGT ATATATTGAA AAATATTTTA ACAGAGACAA GGTATGGAA GTTAATATAG AGATAGATGA AAGTGA CTG AAGGATATGA ATGAAAATGC TATAAAAGAA GAATTTAAGG TTGCAAAAGT AACTGTAGAT GGAGATACAT ATGGAACCGT AGGTATAAGA ACTAAAGGAA ATTCAGTCT TACATCTGTA GCAAATAGTG ATAGTGATAG ATACAGCTAT AAGATTAATT TTGATAAGTA TAATACTAGT CAAAGTATGG AAGGGCTTAC TCAATTAAT CTTAATAACT GTTACTCTGA CCCATCTTAT ATGAGAGAGT TTTTAACATA TAGTATTTGC GAGGAAATGG GATTAGCGAC TCCAGAATTT GCATATGCTA AAGTCTCTAT AAATGGCGAA TATCATGGTT TGTATTTGGC AGTAGAAGGA TTAAAGAGT CTTATCTTGA AAATAATTTT GGTAATGTAA CTGGAGACTT ATATAAGTCA GATGAAGGAA GCTCGTTGCA ATATAAGGA GATGACCCAG AAAGTTACTC AAACCTAATC GTTGAAAGTG ATAAAAAGAC AGCTGATTGG TCTAAAATTA CAAAACCTATT AAAATCTTTG GATACAGGTG AAGATATTGA AAAATATCTT GATGTAGATT CTGTCCTTAA AAATATAGCA ATAAATACAG CTTTATTAATA CCTGTAGATC TATCAAGGCA GTTTTGCCCA TAACTATTAT TTATATGAGC AAGATGGAGT ATTTCTATG TTACCATGGG ATTTTAATAT GTCATTTGGT GGATTTAGTG GTTTTGGTGG AGGTAGTCAA TCTATAGCAA TTGATGAACC TACGACAGGT AATTTAGAAG ACAGACCTCT CATATCCTCG TTATTAATAA(서열 번호 13).
- [0214] 서열 번호 13의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열은 하기와 같다:
- [0215] KIKKFLLIS IMIIFLCV VGVYSTSSNKS VDLSDVYIE KYFNDRKVM V NIEIDESDL KDMNENAIKE EFKVAKVTVD GDTYGNVGIR TKGNSSLTSV ANSDSDRYSY KINFDKYNTS QSMGLTQLN LNNCYSDPSY MREFLTYSIC EEMGLATPEF AYAKVSINGE YHGLYLAVEG LKESYLENNF GNVTDLYKS DEGSSLQYKG DPESYSNLI VESDKKTADW SKITKLLKSL DTGEDIAEYLD DVDSVLKNIA INTALLNLDS YQGSFAHNY LYEQDGVFSM LPWDFNMSFG FSGFGGGSQS SIAIDEPTTG NLEDRPLISS LLK (서열 번호 21).
- [0216] 그리고, 젠뱅크 등록 번호 NZ_AAML04000007의 영역 462824 내지 463732; 하기 뉴클레오타이드 서열을 갖는 씨. 디피실레 QCD-32g58_디피실레_bld4_cont00007:
- [0217] AAAAAAGAGA CACACAAAAC AAAATACCAT AAATATCTGG AAGAGATAGT AACAAAATAC CTAGATTCAG ACTATTTAGA GAATATGACA ACAAATGTC ATGACATGAT AGCATCATAT GTAAAGAAG ACCCAACAGC ATTTTATACT TATGAAGAAT TTGAAAAAAA TATAACATCT TCAATGAAG ATTCTAGTGA TAATAAGGGA TTTGGTAATA AAGGGTTTGA CAACAATAAC TCTAATAACA GTGATTCTAA TAATAATTCT AATAGTGAAA ATAAGCGCTC TGGAAATCAA AGTGATAAAA AAGAAGTTAA TGCTGAATTA ACATCAAGCG TAGTCAAAAC TAATACAGAT

AATGAACTG AAAATAAAC TACAAATGAT AGCGAAAGTA AGAATAATAC AGATAAAGAT AAAAGTGGA ATGATAATAA TCAAAAGCTA
GAAGGTCCTA GGGGTAAAGG AGGTAAGTCA ATACCAGGGG TTTTGGAAGT TGCAGAAGAT ATGAGTAAAA CTATAAAATC TCAATTAAGT
GGAGAACTT CTTCGACAAA GCAAACTCT GGTGATGAAA GTTCAAGTGG AATTAAAGGT AGTGAAAAGT TTGATGAGGA TATGAGTGGT
ATGCCAGAAC CACCTGAGGG AATGGATGGT AAAATGCCAC CAGGAATGGG TAATATGGAT AAGGGAGATA TGAATGGTAA AAATGGCAAT
ATGAATATGG ATAGAAATCA AGATAATCCA AGAGAAGCTG GAGGTTTTGG CAATAGAGGA GGAGGCTCTG TGAGTAAAC AACACATAC
TTCAAATAA TTTTAGGTGG AGCTTCAATG ATAATAATGT CGATTATGTT AGTAGGTGTA TCAAGGGTAA AGAGAAGAAG ATTTATAAAG
TCAAAATAA (서열 번호 14).

[0218] 서열 번호 14의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0219] KNETHKTKYH KYLEEIVTKY LDSDYLENMT TKLHDMIASY VKEDPTAFYT YEEFEKNITS SIEDSSDNKG FGNKGFNNN SNNSDSNNNS
NSENKRSGNQ SDKKEVNAEL TSSVVKNTD NETENKTTND SESKNNTDKD KSGNDNNQKL EGPRKGKGS IPGVLEVAED MSKTIKSQLS
GETSSTKQNS GDESSGIGK SEKFDEMSG MPEPPEGMDG KMPPGMGNMD KGMNGKNGN MNMDRNQDNP REAGGFNGRG GGSVSKTTTY
FKLILGASM IIMSIMLVGV SRVKRRRFIK SK (서열 번호 22).

[0220] 씨. 디피실레 QCD-66c26에서의 가상 단백질 CD1021

[0221] 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021 (서열 번호 1)에 있어서 유의한 상동성 (0.0의 E 값)을 갖는 하나의 서열을 씨. 디피실레 QCD-66c26에서 찾아내었다.

[0222] 제뱅크 등록 번호 NZ_ABFD01000037의 영역 15690 내지 17597의 상보체; 하기 뉴클레오티드 서열을 갖는 씨. 디피실레 QCD-66c26 contig00122:

[0223] ATGAAAGATA AAAAATTTAC CCTTCTTATC TCTATTATGA TTATATTTTT ATGTGCTGTA TTGGAGTTT ATAGTACATC TAGCAACAAA
AGTGTGTGATT TATATAGTGA TGTATATATT GAAAAATATT TTAACAGAGA CAAGGTTATG GAAGTTAATA TAGAGATAGA TGAAAGTGAC
TTGAAGGATA TGAATGAAAA TGCTATAAAA GAAGAATTGA AGGTTGCAAA AGTAACTGTA GATGGAGATA CATATGGAAA CGTAGGTATA
AGAACTAAAG GAAATCAAG TCTTACATCT GTAGCAAATA GTGATAGTGA TAGATACAGC TATAAGATTA ATTTTGATAA GTATAATACT
AGTCAAAGTA TGGAAGGGCT TACTCAATTA AATCTTAATA ACTGTTACTC TGACCCATCT TATATGAGAG AGTTTTTAAC ATATAGTATT
TGCGAGGAAA TGGGATTAGC GACTCCAGAA TTTGCATATG CTAAAGTCTC TATAAATGGC GAATATCATG GTTTGTATTT GGCAGTAGAA
GGATTAAGG AGTCTTATCT TGAAAATAAT TTTGGTAATG TAACTGGAGA CTTATATAAG TCAGATGAAG GAAGCTCGTT GCAATATAAA
GGAGATGACC CAGAAAGTTA CTCAAATTA ATCGTTGAAA GTGATAAAAA GACAGCTGAT TGGTCTAAAA TTACAAAACCT ATTAATAATCT
TTGGATACAG GTGAAGATAT TGAAAAATAT CTTGATGTAG ATTCTGTCCT TAAAAATATA GCAATAAATA CAGCTTTATT AAACCTTGAT
AGCTATCAAG GCAGTTTTCG CCATAACTAT TATTTATATG AGCAAGATGG AGTATTTTCT ATGTTACCAT GGGATTTTAA TATGTCATTT
GGTGGATTTA GTGGTTTTGG TGGAGGTAGT CAATCTATAG CAATTGATGA ACCTACGACA GGTAATTTAG AAGACAGACC TCTCATATCC
TCGTTATTAA AAAATGAGAC ACACAAAACA AAATACCATA AATATCTGGA AGAGATAGTA ACAAATACC TAGATTGAGA CTATTTAGAG
AATATGACAA CAAATTGCA TGACATGATA GCATCATATG TAAAAGAAGA CCAACAGCA TTTTATACTT ATGAAGAATT TGAAAAAAT
ATAACATCTT CAATTGAAGA TTCTAGTGAT AATAAGGGAT TTGGTAATAA AGGGTTTGAC AACAACTA CTAATAACAG TGATTCTAAT
AATAATTCTA ATAGTGAAAA TAAGCGCTCT GGAATCAAAA GTGATAAAAA AGAAGTTAAT GCTGAATTAA CATCAAGCGT AGTCAAAACT
AATACAGATA ATGAACTGA AAATAAACT ACAATGATA GCGAAAGTAA GAATAATACA GATAAAGATA AAAGTGGAAG TGATAATAAT
CAAAAGCTAG AAGGTCCTAG GGGTAAAGGA GGTAAGTCAA TACCAGGGGT TTTGGAAGTT GCAGAAGATA TGAGTAAAC TATAAATCT
CAATTAAGTG GAGAACTTC TTCGACAAAG CAAACTCTG GTGATGAAAG TTCAAGTGA ATTAAGGTA GTGAAAAGTT TGATGAGGAT
ATGAGTGGTA TGCCAGAAC ACCTGAGGGA ATGGATGGTA AAATGCCACC AGGAATGGGT AATATGGATA AGGGAGATAT GAATGGTAAA
AATGGCAATA TGAATATGGA TAGAAATCAA GATAATCCAA GAGAAGCTGG AGGTTTTGGC AATAGAGGAG GAGGCTCTGT GAGTAAACA
ACAACATACT TCAAATTAAT TTTAGGTGGA GCTTCAATGA TAATAATGTC GATTATGTGA GTAGGTGTAT CAAGGGTAAA GAGAAGAAGA
TTTATAAAGT CAAATAA (서열 번호 15).

[0224] 서열 번호 15의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0225] MKDKKFTLLI SIMIIFLCV VGVYSTSSNK SVDLYSDVYI EKYFNDRKVM EVNIEIDESD LKDMNENAIK EEFKVAKVTV DGDYGNVGI
RTKGNSSLTS VANSDDRY S YKINFDKYNT SQSMEGLTQL NLNCCSYDPS YMREFLYSI CEEMGLATPE FAYAKVSING EYHGLYLAVE
GLKESYLENN FGNVTGDL YK SDEGSSLQYK GDDPESYSLN IVESDKKTAD WSKITKLLKS LDTGEDIEKY LDVDSVLKNI AINTALLNLD
SYQGSFAHNY YLYEQDGVFS MLPWDFNMSF GGFSGFGGGS QSI AIDEPTT GNLEDRLPIS SLLKNETHKT KYHYLEEIV TKYLDSDYLE
NMTTKLHDMI ASYVKEDPTA FYTYEEFEKN ITSSIEDSSD NKGFGNKGF NNSNNSDSN NNSNSENKRS GNQSKKEVN AELTSSVVK
NTDNETENKT TNDSESKNNT DKDKSGNDNN QKLEGPRGKG GKSIPGVLEV AEDMSKTIKS QLSGETSSTK QNSGDESSG IKGSEKFDED
MSGMPEPPEG MDGKMPPGMG NMDKGMNGK NGNMNMDRNQ DNP REAGGF NRGGSVSKT TTYFKLILGG ASMI IMSIML VGVSRVKRRR

FIKSK (서열 번호 23).

[0226] 도 1은 씨. 디피실레 균주 630 유래의 가상 CD1021 단백질 YP_001087502의 아미노산 서열 (서열 번호 1), 씨. 디피실레 QCD-32g58 유래의 ZP_01804840의 아미노산 서열 (서열 번호 11), 씨. 디피실레 QCD-32g58 유래의 ZP_01804841의 아미노산 서열 (서열 번호 12), 씨. 디피실레 QCD-32g58 유래의 영역 461827 내지 462825 NZ_AAML04000007의 아미노산 서열 (서열 번호 21), NZ_AAML04000007 씨. 디피실레 QCD-32g58의 영역 462824 내지 463732의 아미노산 서열 (서열 번호 22), 및 씨. 디피실레 QCD-66c26 유래의 영역 15690 내지 17597 NZ-ABFD01000037의 상보체의 아미노산 서열 (서열 번호 23) 사이의 높은 정도의 상동성을 보여준다. 콘센서스 서열이 서열 번호 38로서 예시되어 있다.

[0227] 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 세포 표면 단백질

[0228] 씨. 디피실레 균주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 세포 표면 단백질 (서열 번호 5)에 있어서 씨. 디피실레 균주 630에서 유의한 상동성 (0.0의 E 값)을 갖는 하기의 추가의 서열들을 찾아내었다.

[0229] 젠뱅크 등록 번호 YP_001087516, 세포 표면 단백질 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제, 씨. 디피실레 균주 630, 하기 아미노산 서열을 가짐:

[0230] MLSKEINMRR NTKLLTTGIL SMAIVPTMA FATESNAMEN NADLNINLEK KSIVLGSTSK VSVKFKEKPD ADSITLKYKC YDMLDPTTLN YNQSTESYEG TINYNKDPEY LNVWELQGIT INSKNNPKTL NKQLEKMGL NLKDYNVTQE CIIEDITSRK DVNKYLRKTS APITELTGSD RYETAVKISK EGWKNQSDKV VIINGDVSID GIISTPLATT YNAPILLVEK NNPNSVKSE LKRLNPRDVI IIGDENAISK TTANQIKSTV NASQTRLKGS NRYETSLLIA KEIDKNHDVE KVIYITNANGG EVDALTI AAK AGQDKQPIIL TDKNSITDNT YKWLKSEDLQ NAYFIGGPQM ISTNVINKVN DITKDNVTNN RVYGADRHET NANVIKKFYT DDELEAVLVA KSDVLVDALA AGPLAANLKS PILITPKTYV SAYHKENLEA KSANKVYKIG GGLTSKVMSS IASSLSKHNT TPTEPGNSGG KTVMIDPGHG GSDTGTGKPL LGGIREKDYT LNTSLATTEY LRSKGFNVIM TRDSDKTSL NRTALSNSL RPDLFSTIHY NASDTTGNGV EVFYKLKDKD GGTGKTATN ILNRILEKFN LKNRGAKTRT LSTDPTKDYL YVLRNNDMPA VLVECAFLDN EKMSLLNTS NKVKEMGTQI KGIEDSLK (서열 번호 16).

[0231] 그리고, 하기 아미노산 서열을 갖는 젠뱅크 등록 번호 YP_001089297 (씨. 디피실레 630의 세포 표면 단백질):

[0232] MMKKTTLKLLA TGMLSVAMVA PIVALAAENT TANTESNSDI NINLQRKSVV LGSKSNASVK FKEKLNADSI TLNFMCDYMP LEATLNYNEK TDSYEGVINY NKDPEYLNW ELQSIKINGK DEQVLNKED LESMGLNKD YDVTQEFIS DANSTKAVNE YMRKTSAPVK KLAGATRFET AVEISKQGWK DGSSKVIVN GELAADGITA TPLASTYDAP ILLANKDDIP ESTKAELKRLNPSDVIIIGD DGSVSQKAVS QIKSAVNVN TRIGGVDRHE TSLLIAKEID KYHDVNKIYI ANGYAGEYDA LNISSKAGED QQPILLANKD SVPQGTYNWL SSQGLEEAYY IGGSQLSSK IIDQISKIAK NGTSKNRVSG ADRHETNANV IKTFYPDKEL SAMLVAKSDI IVDSITAGPL AAKLKAPILI TPPTYVSAYH STNLSEKTAE TVYQIGDGMK DSVINSIASS LSKHNAPTEP DNSGSAAGKT VVIDPGHGS DSGATSLNG GAQEKKYTLN TALATTEYLR SKGINVMTR DTDKTMALGE RTALSNTIKP DLFTSIHYNA SNGSGNGVEI YYKVKDKNGG TTKTAASNIL KRILEKFNMK NRGIKTRTLD NGKDYLVLVLR NNNYPAILVE CAFIDNKSDM DKLNTAEKVK TMGTQIGIGI EDTVK (서열 번호 17).

[0233] 씨. 디피실레 균주 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 세포 표면 단백질 (서열 번호 5)에 있어서, 유의한 상동성 (0.0의 E 값)을 갖는 하기 서열들을 씨. 디피실레 QCD-32g58에서 찾아내었다.

[0234] 젠뱅크 등록 번호 ZP_01804350 (가상 단백질 CdifQ_04001133; 씨. 디피실레 QCD-32g58), 하기 아미노산 서열을 가짐:

[0235] MFRFKEKPD DSITLKYKCY DMLDPTTLN YNQSTESYEGT INYNKDPEYL NVWELQGITI NSKNNPKTLN KQLEKMGLN LKDYNVTQEC IIEDITSRKD VNKYLRKTS A PITELTGSDR YETAVKISKE GWKNQSDKV IINGDVSIDG IISTPLATTY NAPILLVEKN NNPNSVKSEL KRLNPRDVII IGDENAISK T ANQIKSTVN ASQTRLKGSN RYETSLLIAK EIDKNHDVEK VYITNANGGE VDALTI AAKA GQDKQPIILT DKNSTIDNTY KWLKSEDLQ AYFIGGPQMI STNVINKVND ITKDNVTNNR VYGADRHETN ANVIKKFYTD DELEAVLVA SDVLVDALAA GPLAANLKSP ILITPKTYVS AYHKDNLEAK SANKVYKIGG GLTSKVMNSI ASSLSKHNTT PTEPGNSGGK TVMIDPGHGG SDTGTGKPL GGIKEKDYTL NTSLATTEYL RSKGFNVIMT RDTDKTSLG NRTALSNSLR PDLFTSIHYN ASDTTGNGVE VFYKLKDKDG GTTKTVATNI LNRILEKFN LKNRGAKTRT LSTDPTKDYL VLRNNDMPA VLVECAFLDNE KMSLLNTS NKVKEMGTQIG KGIEDSLK (서열 번호 18).

[0236] 젠뱅크 등록 번호 ZP_01804351 (가상 단백질 CdifQ_04001134; 씨. 디피실레 QCD-32g58), 하기 아미노산 서열을 가짐:

[0237] MLSKEINMRR NTKLLTTGIL SMAIVPTMA FATESNAMEN NADLNINLEK KSIVLGSKSK VSVKFKEKPD ADSITLKYKC YDMLDPTTLN YNQSTGAYEG TINYNQDPEY LNVWELQGIT INSKNNPKTL NGQLEKMGL NLKDYNVTQE CIIEDITSRK DVNKYLRKTS APITELTGSD RYETAVKISK EGWKNQSDKV VIINGDVSID GIISTPLATT YNAPILLVEK NNPNSVKSE LKRLNPKDII IIGDENAISK TTANQIKSTV

NASQTRLNGS NRYETSLIA KEIDKNHDVE KVIYITNANGG EVDALTIAAK AGQDKQPIIL TDKDSITDNT YKWLKSEDLQ NAYFIGGPQM
ISTNVINKVN GITKDSVTNN RVYGADRHEH NANVIKKFYT EDEIEAVLVA KSDVLVDALA AGPLAANLKS PILITPKTYV SAYHKDNLEA
KSANKVYKIG GGLTSKVMSS IASSLSKHNT TPTEPGNSGG KTVMIDPGHG GSAPGNSSGG MIEKDYNLNT SLATTEYLRS KGFNVIMTRD
TDKTLNLSGNR TA (서열 번호 19).

[0238] 그리고, 제벡크 등록 번호 ZP_01802273 (가상 단백질 CdifQ_04003247; 씨. 디피실레 QCD-32g58), 하기 아미노산 서열을 가짐:

[0239] MMKKTTKLLA TGMLSVAMVA PNVALAENT TANTESNSDI NINLQRKSVV LGSKSNASVK FKEKLNADSI TLNFMCDMP LEATLNYNEK
TDSYEGVINY NKDPEYLVNV ELQSIKINGK DEQKVLNKED LESMGLNLKD YDVTQEFIIIS DANSTKAVNE YMRKTSAPVK KLAGATRFET
AVEISKQGWK DGSSKVVIVN GELAADGITA TPLASTYDAP ILLANKDDIP ESTKAELKRL NPSDVIIIGD DGSVSQKAVS QIKSAVNVNV
TRIGGVDRHE TSLLIAKEID KYHDVNKIYI ANGYAGEYDA LNISSKAGED QQPIILANKD SVPQGTYNWL SSQGLEEAYY IGGSQSLSSK
IIDQISKIAK NGTSKNRVSG ADRHETNANV IKTFYPDKEL SAMLVAKSDI IVDSITAGPL AAKLKAPILI TPPTYVSAYH STNLSEKTAG
TVYQIGDGMK DSVINSIASS LSKHNAPTEP DNSGSAAGKT VVIDPGHGGG DSGATSGLNG GAQEKKYTLN TALATTEYLR SKGINVVMTR
DTDKTALGE RTALSNTIKP DLFTSIHYNA SNGAGNGVEI YYKVKDKNGG TTKTAASNIL KRILEKFNMK NRGIKTRTLD NGKDYLYVLR
NNNYPAILVE CAFIDNKSDM DKLNTAEKVK TMGTQIGIGI EDTVK (서열 번호 20).

[0240] 본 발명에서 개시되는 항체는 서열 번호 11, 서열 번호 12, 서열 번호 16, 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 22, 및 서열 번호 23의 아미노산 서열 및 그의 단편 중 하나 이상에 결합될 수 있다. 본 발명에서 개시되는 항체는 서열 번호 13, 서열 번호 14, 및 서열 번호 15의 게놈 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열 및 그의 폴리펩티드 단편 중 하나 이상에 결합될 수 있다.

[0241] 서열 번호 11, 서열 번호 12, 서열 번호 16, 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 22, 및 서열 번호 23의 아미노산 서열 및 그의 단편 중 하나 이상에 결합되는 항체를 본 명세서에 설명된 임의의 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 다양한 방법에 의해 생성할 수 있다. 서열 번호 13, 서열 번호 14, 및 서열 번호 15의 게놈 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열 및 그의 폴리펩티드 단편 중 하나 이상에 결합되는 항체를 본 명세서에 설명된 임의의 다양한 방법에 의해 생성할 수 있다. 임의의 그러한 항체를 샘플 중 씨. 디피실레 포자의 검출 방법에서 사용할 수 있다.

[0242] 실시예 16

[0243] 씨. 디피실레 ATCC 9689 유래의 CD1021의 클로닝 및 서열결정

[0244] CD1021 코딩 서열을 NheI 부위를 갖는 정방향 프라이머 (5'-TAAGCTAGCATGAAAGATAAAAAATTACC-3') (서열 번호 24), XhoI 부위를 갖는 역방향 프라이머 (5'-TTACTCGAGTTTGTACTTATAAATCTTCT-3') (서열 번호 25) 및 주형으로서 ATCC 균주 9689 유래의 게놈 DNA를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. 정지 코돈을 역방향 프라이머로부터 제거하여 상기 서열의 말단에 6-HIS 태그의 부가를 도왔다. 생성된 단편의 크기는 1923 염기쌍 (base pairs, bp)이었다.

[0245] 이와 유사하게, 씨. 디피실레 균주 630에서의 CD1021의 아미노산 잔기 30 내지 120 (서열 번호 9)에 상응하는 영역 (본 명세서에서 "단편 1"로도 지칭됨)을 주형으로서 ATCC 균주 9689 유래의 게놈 DNA를 사용하여 NheI 부위를 포함하는 정방향 프라이머 (5'-ACAGCTAGCATGAAAAGTGTGATTATATAGT-3') (서열 번호 26) 및 XhoI 부위를 갖는 역방향 프라이머 (5'-ACTCTCGAGAGTATTATAC TTATCAAAATTA-3') (서열 번호 27)를 이용하여 증폭시켰다. 생성된 단편은 크기가 294 bp이고, ATG 개시 코돈을 포함하였다.

[0246] 씨. 디피실레 균주 630에서의 CD1021의 아미노산 잔기 194 내지 293 (서열 번호 10)에 상응하는 영역 (본 명세서에서 "단편 2"로도 지칭됨)을 주형으로서 ATCC 균주 9689 유래의 게놈 DNA를 사용하여 NheI 부위를 포함하는 정방향 프라이머 5'-AATGCTAGCATGGTAACTGGAG ACTTATATAAGTCA-3') (서열 번호 28) 및 XhoI 부위를 갖는 역방향 프라이머 (5'-AAACTCGAGTGG TAACA TAGAAAATACTCCAT-3') (서열 번호 29)를 이용하여 증폭시켰다. 생성된 단편은 크기가 321 bp이고, ATG 개시 코돈을 포함하였다.

[0247] 그리고, 씨. 디피실레 균주 630에서의 CD1021의 아미노산 잔기 505 내지 604 (서열 번호 2)에 상응하는 영역 (본 명세서에서 "단편 3"으로도 지칭됨)을 주형으로서 ATCC 균주 9689 유래의 게놈 DNA를 사용하여 NheI 부위를 포함하는 정방향 프라이머 (5'-GCAGCTAGCATGAGTAAACTATAAAATCTCAA-3') (서열 번호 30) 및 XhoI 부위를 갖는 역방향 프라이머 (5'-AATCTCGAGGAAGTATGTTGTTGTTTACT CAC-3') (서열 번호 31)를 이용하여 증폭시켰다. 생성된 단편은 크기가 321 bp이고, ATG 개시 코돈을 포함하였다.

[0248] 생성된 PCR 반응물을 아가로스 젤 (0.8%) 상에서 진행시켰으며, 기대되는 크기의 생성물을 관찰하였다. 제조자의 지시에 따라 제로 블런트(Zero Blunt) TOPO PCR 클로닝 키트 (미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 인비트로젠(Invitrogen))를 사용하여 PCR 단편을 클로닝하였다. 형질전환된 콜로니를 고르고, 카나마이신 (100 µg/ml) 을 포함하는 LB에서 37℃에서 16시간 동안 배양하였다. 쿼이프랩 스핀 미니프랩 키트(Qiaprep spin miniprep kit) (미국 캘리포니아주 발렌시아 소재의 쿼아젠(Qiagen))를 사용하여 플라스미드를 이들 배양물로부터 단리하고, 플라스미드를 EcoRI (인비트로젠)으로 절단하고, 아가로스 젤에 의해 분석하였다. 인서트를 갖는 클론을 빅다이(BigDye)(등록상표) 터미네이터(Terminator) v1.1 사이클 시퀀싱 키트(Cycle Sequencing Kit) (미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems))를 사용하여 M13 정방향 -20 프라이머 (5'-GTAAACGACGCCAGT-3') (SEQ ID NO:32) 및 M13 역방향 -27 프라이머 (5'-CAGGAACAGCTATGAC-3') (서열 번호 33)를 이용하여 서열결정하였다. 적절한 내부 프라이머를 사용하여 1923 bp CD1021 코딩 서열의 전 서열을 얻었다. 4개의 클로닝 반응 각각에 있어서의 추가의 특성화를 위하여 3개의 클론을 선발하였다. 1923 bp CD1021 코딩 서열에 있어서, 3개의 클론은 pCD1021-1, pCD1021-2, 및 pCD1021-3이었다. 단편 1에 있어서, 3개의 클론은 pCD1021-Fr1-1, pCD1021-Fr1-2, 및 pCD1021-Fr1-3이었다. 단편 2에 있어서, 3개의 클론은 pCD1021-Fr2-1, pCD1021-Fr2-2, 및 pCD1021-Fr2-3이었다. 단편 3에 있어서, 3개의 클론은 pCD1021-F3-1, pCD1021-Fr3-2, 및 pCD1021-Fr3-3이었다.

[0249] 플라스미드 pCD1021-2 중 씨. 디피실레 ATCC 9689 CD1021 단편의 뉴클레오티드 서열은 하기와 같다:

[0250] ATGAAAGATA AAAAATTTAC CCTTCTTATC TCGATTATGA TTATATTTT ATGTGCTGTA GTTGGAGTTT ATAGTACATC TAGCAACAAA
AGTGTGTGATT TATATAGTGA TGTATATATT GAAAAATATT TTAACAGAGA CAAGGTTATG GAAGTTAATA TAGAGATAGA TGAAAGTGAC
TTGAAGGATA TGAATGAAAA TGCTATAAAA GAAGAATTTA AGGTTGCAAA AGTAACTGTA GATGGAGATA CATATGGAAA CGTAGGTATA
AGAACTAAAG GAAATCAAG TCTTATATCTGTAGCAAATA GTGATAGTGA TAGATACAGC TATAAGATTA ATTTTGATAA GTATAATACT
AGTCAAAGTA TGGAAGGGCT TACTCAATTA AATCTTAATA ACTGTTACTC TGACCCATCT TATATGAGAG AGTTTTTAAC ATATAGTATT
TGCGAGGAAA TGGGATTAGC GACTCCAGAA TTTGCATATG CTAAAGTCTC TATAAATGGC GAATATCATG GTTTGTATTT GGCAGTAGAA
GGATTAAGG AGTCTTATCT TGAAAATAAT TTTGGTAATG TAACTGGAGA CTTATATAAG TCAGATGAAG GAAGCTCGTT GCAATATAAA
GGAGATGACC CAGAAAGTTA CTCAACTTA ATCGTTGAAA GTGATAAAAA GACAGCTGAT TGGTCTAAAA TCACAAAACCT ATTAATCT
TTGGATACAG GTGAAGATAT TGAAAAATAT CTTGATGTAG ATTCTGTCCT TAAAAATATA GCAATAAATA CAGCTTTATT AAACCTTGAT
AGCTATCAAG GGAGTTTTCG CCATAACTAT TATTTATATG AGCAAGATGG AGTATTTTCT ATGTTACCAT GGGATTTTAA TATGTCATTT

[0251] GGTGGATTTA GTGGTTTTGG TGGAGGTAGT CAATCTATAG CAATTGATGA ACCTACGACA GGTAATTTAG AAGACAGACC TCTCATATCC
TCGTTATTAA AAAATGAGAC ATACAAAACA AAATACCATA AATATCTGGA AGAGATAGTA ACAAATACC TAGATTCAGA CTATTTAGAG
AATATGACAA CAAAATTGCA TGACATGATA GCATCATATG TAAAGAAGA CCCAACAGCA TTTTATACTT ATGAAGAATT TGAAAAAAT
ATAACATCTT CAATTGAAGA TTCTAGTGAT AATAAGGGAT TTGGTAATAA AGGGTTTGAC AACAACTA CTAATAACAG TGATTCTAAT
AATAATTCTA ATAGTGAAAA TAAGCGCTCT GGAATCAAAA GTGATGAAAA AGAAGTTAAT GCTGAATTAA CATCAAGCGT AGTCAAAGCT
AATACAGATA ATGAACTAA AAATAAACT ACAAATGATA GTGAAAGTAA GAATAATACA GATAAAGATA AAAGTGGAAA TGATAATAAT
CAAAAGCTAG AAGGTCCTAT GGGTAAAGGA GGTAAGTCAA TACCAGGGGT TTTGGAAGTT GCAGAAGATA TGAGTAAAC TATAAATCT
CAATTAAGTG GAGAACTTC TTCGACAAAG CAAACTCTG GTGATGAAAG TTCAAGTGA ATTAAGGTA GTGAAAGTT TGATGAGGAT
ATGAGTGGTA TGCCAGAACC ACCTGAGGGA ATGGATGGTA AAATGCCACC AGGAATGGGT AATATGGATA AGGGAGATAT GAATGGTAAA
AATGGCAATA TGAATATGGA TAGAAATCAA GATAATCCAA GAGAAGCTGG AGGTTTTGGC AATAGAGGAG GAGGCTCTGT GAGTAAACA
ACAACATACT TCAAATTAAT TTTAGGTGGA GCTTCAATGA TAATAATGTC GATTATGTTA GTTGGTGAT CAAGGGTAAA GAGAAGAAGA
TTTATAAAGT CAAAA (서열 번호 39). 플라스미드 pCD1021-2 중 CD1021 단편의 번역된 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0252] MKDKKFTLL ISIMI IFLCAVVG VYSTSSNKSVDLYSDVY IEKYFN RDKVMEVNI EIDESDLKDMNENAIKEEFKVAKVTVDGDTYGNVG IRTKGNSSLISVA
NSDSDRYSYKINF DKYNTS QSMEGLTQLNLN CYS DPSYMEFLTYS ICEEMGLATPEFAYAKVS INGEYHGLYLAVEGLKESYLENNFGNVTGDLYKSDEG
SSLQYKGD DPESYNL I VESDKKTADWSK I TKLLKSLDTGED IEKYLDVDSVLKNI AINTALLNLD SYQGSFAHNYLYEQDGVF SMLPWDFNMSFGGFSGF
GGGSQSIA IDEPTTGNLEDRPL ISSLLKNETYKTKYHKYLEE I VTKYLDSDYLENMTTKLHDMI ASYVKEDPTAFYTYEEFEKNITSSIEDSSDNKGFGNKG
FDNNNSNNSDNNNSNSENKRSNGQSDEKEVN AELTSSVVKANTDNETKNKTNDSESKNNTDKDKSGNDNNQKLEGP MGKGKSI PGVLEVAEDMSKTIKS
QLSGETSSTKQNSGDESSG IKGSEKFDEDMSGMPEPPEGMGDKMPPGMGNMDKGD MNGKNGNMNMDRNDQNP REAGGFGNRGGGSVSKTTTYFKL ILGGAS
MIIMSIMLVGVS RVKRRRIKSK (서열 번호 45).

[0253] 플라스미드 pCD1021-Fr1-1 중 씨. 디피실레 ATCC 9689 CD1021 단편 (30 내지 120 아미노산 잔기)의 뉴클레오티드 서열은 하기와 같다:

- [0254] ATGAAAAGTG TTGATTATA TAGTGATGTA TATATTGAAA AATATTTTAA CAGAGACAAG GTTATGGAAG TTAATATAGA GATAGATGAA AGTGACTTGA AGGATATGAA TGAAAATGCT ATAAAAGAAG AATTAAAGGT TGCAAAAGTA ACTGTAGATG GAGATACATA TGGAAACGTA GGTATAAGAA CTAAAGGAAA TTCAAGTCTT ATATCTGTAG CAAATAGTGA TAGTGATAGA TACAGCTATA AGATTAATTT TGATAAGTAT AATACT (서열 번호 40).
- [0255] 플라스미드 pCD1021-Fr1-1 중 CD1021 단편의 번역된 아미노산 서열 (30 내지 120 아미노산 잔기)은 하기와 같다:
- [0256] MKSVDLYSDVYIEKYFNDRDKVMEVNIIEIDESDLKDMNENAIKEEFKVKVKTVDGDTYGNVGIRTKGNSSLISVANSDDRYSYKINFDKYNT (서열 번호 46).
- [0257] 플라스미드 pCD1021-Fr2-1 중 씨. 디피실레 ATCC 9689 CD1021 단편 (194 내지 293 아미노산 잔기)의 뉴클레오티드 서열은 하기와 같다:
- [0258] ATGGTAACTG GAGACTTATA TAAGTCAGAt GAAGGaAGCT CGTTGCAATA TAAAGGAGAT GACCCAGAAA GTTACTCAAA CTTAATCGTT GAAAGTGATA AAAAGACAGC TGATTGGTCT AAAATcACAA AACTATTAAA ATCTTTGGAT ACAGGTGAAG ATATTGAAAA ATATCTTGAT GTAGATTCTG TCCTTAAAAA TATAGCAATA AATACAGCTT TATTAAACCT TGATAGCTAT CAAGGGAGTT TTGCCATAA CTATTATTTA TATGAGCAaG ATGGAGTATT TTCTATGTTACCA (서열 번호 41).
- [0259] 플라스미드 pCD1021-Fr2-1 중 CD1021 단편의 번역된 아미노산 서열 (194 내지 293 아미노산 잔기)은 하기와 같다:
- MVTGDLYKSDEGSSLQYKGDDPESYSNLIVESDKKTADWSKITKLLKSLDTGEDIEKYLDVDSVLKNIINTALLNLDYQGSFAHNYLYEQDGVFSMLP (서열 번호 47).
- [0260] 플라스미드 pCD1021-Fr3-1 중 씨. 디피실레 ATCC 9689 CD1021 단편 (505 내지 604 아미노산 잔기)의 뉴클레오티드 서열은 하기와 같다:
- [0261] ATGAGTAAAA CTATAAAATC TCAATTAAGT GGAGaAACTT CTTGCACAAA GCAAAACTCT GGTGATGAAA GTTCAAGTGG AATTAAGGT AGTGAAAAGT TTGATGAGGA TATGAGTGGT ATGCCAGAAC CACCTGAGGG AATGGATGGT AAAATGCCAC CAGGAATGGG TAATATGGAT AAGGGAGATA TGAATGGTAA AAATGGCAAT ATGAATATGG ATAGAAATCA AGATAATCCA AGAGAAGCTG GAGGTTTTGG CAATAGAGGA GGAGGCTCTG TGAGTAAAAA AACAACATAC TTC (서열 번호 42).
- [0262] 플라스미드 pCD1021-Fr3-1 중 CD1021 단편의 번역된 아미노산 서열 (505 내지 604 아미노산 잔기)은 하기와 같다:
- [0263] MSKTIKSQLSGETSSTKQNSGDESSGIGKSEKFDDEMSGMPEPPEGMGMDGKMPGMDKGMNGKNGNMMDRNDQNPREGGFNGRGGGSVSKTTTTYF (서열 번호 48).
- [0264] 실시예 17
- [0265] 씨. 디피실레 ATCC 9689 CD1021 클론의 발현
- [0266] 실시예 16에서 얻은 재조합 플라스미드 pCD1021-2, 및 발현 벡터 pET21-a(+) (미국 위스콘신주 매디슨 소재의 노바젠(Novagen))를 제조자의 지시에 따라 제한 효소 NheI 및 XhoI (미국 매사추세츠주 이프스위치 소재의 뉴잉글랜드 바이오랩스)을 이용하여 개별적으로 절단하였다. 제한 효소 절단된 pCD1021-2 DNA를 아가로스 젤 (0.8%) 상에서 진행시키고, 전장 CD1021 단편을 퀴아퀵(Qiaquick) 젤 추출 키트 (퀴아젠)를 사용하여 젤로부터 정제하였다. 생성된 단편 (1917 bp)을 제조자의 지시에 따라 T4 DNA 리가아제 (인비트로젠)를 사용하여 제한 효소 절단 발현 벡터 pET21-a(+) 내에 라이게이션시켰다.
- [0267] 라이게이션된 혼합물을 사용하여 TOP10 화학적 적격성 이. 콜라이(E. coli) 세포를 형질전환시키고, 암피실린 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 포함하는 LB 한천 상에 도말하였다. 플레이트를 37°C에서 12 내지 16시간 동안 인큐베이션하고, 재조합 클론을 고르고, 암피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 포함하는 LB에서 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 알칼리 용해 프로토콜 (미니프랩 키트, 퀴아젠)을 사용하여 미니프랩에 의해 이들 배양물로부터 플라스미드를 분리하고, 플라스미드를 NheI 및 XhoI로 절단하고, 아가로스 젤에 의해 분석하였다. 전장 CD1021 인서트를 갖는 클론을 선발하고, 단백질 발현에 대하여 시험하였는데, 이는 제조자의 지시에 따른 것이다.
- [0268] 이와 유사하게, 실시예 16에서 얻은 클론 CD1021-Fr1-1, CD1021-Fr2-2, 및 CD1021-Fr3-1의 단편 1, 단편 2 및 단편 3을 NheI 및 XhoI 제한효소로 절단하고, NheI/XhoI 제한효소 절단된 pET21a+ 내로 클로닝하였다. 상기에 설명한 바와 같이 재조합 클론을 고르고 분석하였다. 인서트를 갖는 클론을 선발하고, 단백질 발현에 대하여

시험하였는데, 이는 제조자의 지시에 따른 것이다.

[0269] 재조합 클론으로 BLR(DE3)의 적격 세포를 형질전환시키고, 이를 암피실린 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 포함하는 LB 한천 상에 도말하였다. 플레이트를 37°C에서 12 내지 16시간 동안 인큐베이션하였다. 몇 개의 콜로니를 고르고 암피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 포함하는 5 ml의 LB에서 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 하룻밤 배양한 클론을 암피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 포함하는 5 ml의 LB 내로 1:100으로 희석시키고, 0.6 내지 0.7의 OD600이 되도록 배양하였다. 0.4 mM 아이소프로필 β -D-1-티오갈락토피라노사이드 (IPTG; 미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마)를 사용하여 37°C 또는 15°C에서 3시간 동안 랩-라인 맥스 큐(Lab-Line MaxQ) 4000 배양 및 냉장식 진탕기 (Incubated and Refrigerated Shaker) (미국 아이오와주 두부크 소재의 반스테드 인터내셔널(Barnstead International))를 사용하여 클론을 유도하였다.

[0270] 유도한 세포를 4°C에서 10분 동안 5000 rpm에서 회전시키고, 0.1 mM 트리스-HCl 완충액 (pH 8.0) 1 ml 중에 재현탁시켰다. 세포를 용해시키기 위하여 10초 동안, 0.3175 cm (1/8 인치) 테이퍼형 마이크로팁을 사용하여 브랜슨 디지털 음파 처리기(Branson Digital Sonifier) 모델 S-250D (미국 코네티컷주 덴버리 소재의 브랜슨 (Branson))를 이용하여 세포를 초음파 처리하였다. 세포 추출물을 SDS-PAGE로 분석하였다. 젤을 쿠마시 블루 (Coomassie blue)로 염색하였으며, 유도된 세포는 기대되는 분자량의 재조합 단백질의 보다 우수한 발현을 37°C에서보다 15°C에서 나타내었다.

[0271] 실시예 18

[0272] 씨. 디피실레 ATCC 9689 유래의 아미다아제 (CD1036)의 클로닝 및 서열결정

[0273] 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 세포 표면 단백질 코딩 서열을 NcoI 부위를 갖는 정방향 프라이머 (5'-AATCCATG G TAAGTAAGGAGATTAATATG-3') (서열 번호 34), XhoI 부위를 갖는 역방향 프라이머 (5'-TTCCTCGAGTTTAAATGAATCTTCTATTC-3') (서열 번호 35) 및 주형으로서 씨. 디피실레 ATCC 균주 9689 유래의 게놈 DNA를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. 정지 코돈을 역방향 프라이머로부터 제거하여 상기 서열의 말단에의 6-HIS 태그의 부가를 도왔다. 생성된 단편의 크기는 2045 bp였다.

[0274] 이와 유사하게, 씨. 디피실레 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 세포 표면 단백질의 아미노산 잔기 294 내지 393 (서열 번호 6)에 상응하는 영역을 주형으로서 ATCC 균주 9689 유래의 게놈 DNA를 사용하여 NcoI 부위를 갖는 정방향 프라이머 (5'-AGG CCA TGGATAAAAATCATGATGTGGAA-3') (서열 번호 36) 및 XhoI 부위를 갖는 역방향 프라이머 (5'-TTTCTCGAGGTTGCATTG TTTCTGTCT-3') (서열 번호 37)를 이용하여 증폭시켰다. 생성된 단편은 크기가 317 bp이고, ATG 개시 코돈을 포함하였다.

[0275] 실시예 16에 설명한 절차를 이용하여, 생성된 PCR 단편을 제로 블런트 TOPO PCR 클로닝 키트 (미국 캘리포니아 주 샌디에고 소재의 인비트로젠)를 사용하여 클로닝하고 재조합 클론을 서열결정하였다. 3개의 클론을 두 클로닝 반응물 각각에 있어서 특성화하였다. 2045 bp CD1036 코딩 서열에 있어서, 3개의 클론은 pCD1036-1, pCD1036-2, 및 pCD1036-3이었다. 단편 1에 있어서, 3개의 클론은 pCD1036-Fr1-1, pCD1036-Fr1-2, 및 pCD1036-Fr1-3이었다.

[0276] 플라스미드 pCD1036-2에서의 씨. 디피실레 ATCC 9689 CD1036 단편의 뉴클레오티드 서열은 하기와 같다:

[0277] ATGGTAAGTA AGGAGATTAA TATGAGAAGA AATACAAAAT TATTAACAAC AGGGATTCTT TCAATGGCAA TCGTCGCACC TACAATGGCA
TTTGCTACTG AATCTAATGC TATGGAATAT AACGCTGATT TAAATATAAA CTTAGAGAAA AAAAGTATCG TTTTAGGTAG CAAATCAAAA
GTTAGTGTCA AATTTAAAGA AAAACCAGAT GCAGATAGCA TTAcATTAAA GTATAAATGC TATGACATGC CATTGAATAC AACTCTAAAT
TACAATCAAT CAACTGGGGC ATATGAAGGA AcTATCAaTT ATAACCAAGA CCCAGAATAT CTAAATGTTT GGGAACTACA AGGGATAACA
ATAAACAGCA AAAaTAATCa TAAAACTTTA AACAGACAAG ACCTAGAAAA GcTGGGATTA AATTTAAAAG ACTATAATGT AACACAGGAA
TGTATAATTG AAGAtATAAC TTCTAGAAAA GATGTAAATA AATATTTGaG AAAAACTTCT TCACCTATTA CAGAAGTTAC AGGAAGTGAT
AGATATGAAA CAGCAGTTAA AATAAGTAAA GAGGGCTGGA AAAATGGTTC AGATAAGGTA GTTATAATAA ATGGGGATGT AAGTATAGAT
GGCATTATAT CAACTCCACT GGCAACCACA TATAATGCAC CAATACTTTt GGTGAAAAA AACAATGTAC CTAATAGTGT AAAATcAGAA
TTAAAGCGCC TAAACCCTAA AGATATAATT ATAATTGGAG ATGAGAATGC TATTCTTAAA ACTACTGCTA ATCAAATTA ATCAACTGTA
AATGCTAGTC AAACACGTTT AAATGGTTCT AATAGATATG AGACATCTTT ATTGATAGCA AAGGAAATAG ATAAAAATCA TGATGTGGAA
AAAGTATACA TAACAAATGC TAATGGCGGA GAaGTGGATG CACTTACTAT AGCAGCAAAA GCAGGTCAAG ACAAGCAACC AATTATATTA
ACTGATAAAG ATAGTATTAC AGACAATACA TATAAATGGT TAAAGAGTGA GGATTACAA AATGCTTATT TTATAGGTGG TCCTCAAATG
ATATCAACAA ATGTTATAAA TAAGGTAAAt GGAATAACTA AAGATAGTGT TACTAATAAT AGAGTATACG GAGCAGATAG ACACGAAACA
AATGCAACG TAATAAAAAA ATTCTATACA GATGATGAGT TAGAGGCTGT TTAGTAGCT AAATCAGATG TACTTGTGTA TGCTTTAGCA

GCAGGTCCAT TGGCTGCGAA CTAAAAATCT CCAATACTTA TAACACCAAA GACGTATGTA TCTGCATACC ATAAAGATAA TTTAGAAGCT
AAATCAGCTA ATAAGGTATA CAAAATAGGA GGAGGATTGA CTTCTAAGGT AATGAGCTCT ATAGCATCAT CATTATCTAA ACACAATACG
ACTCCAACAG AACCAGGAAA TAGTGGGGGC AAGACAGTTA TGATTGACCC AGGGCATGGT GGTTTCAGCAC CTGGAATTC ATCTGGAGGA
ATGATTGAAA AAGATTACAA TTTAAATACT TCACTTGCAA CAACTGAATA TTTACGTTCA AAGGGATTCA ATGTAATAAT GACAAGAGAC
ACAGATAAGA CTTTATCTCT TGGAAATAGA ACTGCTCTAT CTAATTCATT GAAACCAGAT TTATTTACAA GTATACATTA TAATGGCTCA
ACTAATAAAC AAGGTCATGG TGTAGAAGTA TTTTATAAGC TTAAGATAA AAATGGAGGG ACTACTAAAA CTGTAGCTAC CAATATATTA
AATAGAATTT TAGAGAAATT TAAACTTACA AATAGAGGTA TAAAAACAAG AGTACTTCCT AGTGATTCTA CAAAAGATTA TTTATACGTT
TTAAGAAGTA ATGATATGCC AGCTGTACTT GTAGAATGTG CATTTTGGGA TAATGAAAAT GATATGAGTT TAATAAACTC ATCTGCAAAA
GTAAAAGAAA TGGGTACACA AATAGGTAAA GGAATAGAAG ATTCATTAAA A (서열 번호 43). 플라스미드 pCD1036-2 중
CD1036 단편의 번역된 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0278] MVSKEINMRRNTKLLTTGILSMAIVAPTMAFATESNAMENNADLNINLEKKSIVLGSKSKSVKFKPKDADSI TLKYKYDMPNLNTLNYNQSTGAYEGTI
NYNQDPEYLNWELQGITINSKNHKTLLNRQDLEKLGLNLKDYNTQECI IEDITSRKDVNKYLRTSSPITELTGSDRYETAVKISKEGWKNGSDKVVIIIN
GDVSDIGIISTPLATTYNAPILLVEKNNVPNSVKSELKRLNPKDIIIGDENAI SKTTANQIKSTVNASQTRLNGSNRYETSLIIAKEIDKNHDEKVVYITN
ANGGEVDAL TIAAKAGQDKQPI ILTDKDSITDNTYKWLKSEDLQNAFYIGGPQMISTNVINKVNGITKDSVTNNRVYGADRHETNANVIKKFYTDDELEAVL
VAKSDVLVDALAAGPLAANLKSPI LITPKTYVSAYHKDNLKASANKVYKIGGGLTSKVMSSIASLSKHNTTPTEPGNSGGKTVMIDPGHGSAPGNSSGG
MIEKDYNLNTSLATTEYLRSKGFNVIMTRDTDKTSLGNRTALSNSLKPDLFTSIHYNGSTNKQGHGVEVFYKLKDKNGGTTKTATNINLRILEKFKLTNR
GIKTRVLPDSTKDYLYVLRSDMPAVLVECAFLDNENDMSLINSSAKVKEMGTQIGKGIEDSLK (서열 번호 49).

[0279] 플라스미드 pCD1036-Fr1-1 중 씨. 디피실레 ATCC 9689 CD1036 단편 (294 내지 393 아미노산 잔기)의 뉴클레오티드 서열은 하기와 같다:

[0280] ATGGATAAAA ATCATGATGT GAAAAAGTA TACATAACAA ATGCTAATGG CGGAGAAgTG GATGCACTTA CTATAGCAGC AAAAGCAGGT
CAAGACAAGC AACCAATTAT ATTAAGTATG AAAGATAGTA TTACAGACAA TACATATAAA TGGTTAAAGA GTGAGGATTT ACAAATGCT
TATTTTATAG GTGGTCCTCA AATGATATCA ACAAATGTTA TAAATAAGGT AAAATGGAATA ACTAAAGATA GTGTTACTAA TAATAGAGTA
TACGGAGCAG ATAGACACGA AACAAATGCAAAC (서열 번호 44).

[0281] 플라스미드 pCD1036-Fr1-1 중 번역된 아미노산 서열 9689 CD1036 단편 (294 내지 393 아미노산 잔기)은 하기와 같다:

[0282] MDKNHDEKVVYITNANGGEVDAL TIAAKAGQDKQPI ILTDKDSITDNTYKWLKSEDLQNAFYIGGPQMISTNVINKVNGITKDSVTNNRVYGADRHETNAN
(서열 번호 50).

[0283] 실시예 19

[0284] 씨. 디피실레 ATCC 9689 아미다아제 클론의 발현

[0285] 실시예 17에 설명한 절차를 이용하여, 실시예 18에서 얻어진 재조합 플라스미드 pCD1036-2 유래의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 세포 표면 단백질의 전체 코딩 서열, 및 발현 벡터 pET21-d(+) (노바젠)를 제한 효소 NcoI 및 XhoI (미국 매사추세츠주 이프스위치 소재의 뉴 잉글랜드 랩스)로 절단하고, pET21-d(+) 내로 클로닝하였다. 이와 유사하게, 실시예 17에 설명한 절차에 따라, 재조합 플라스미드 pCD1036-Fr-1 유래의, 씨. 디피실레 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제 세포 표면 단백질의 아미노산 잔기 294 내지 393 (서열 번호 6)에 상응하는 단편을 제한 효소 NcoI 및 XhoI로 절단하고, pET21-d(+) 내로 클로닝하였다. 실시예 17에 설명한 바와 같이 재조합 클론을 고르고 분석하였다. 인서트를 갖는 클론을 선발하고, 단백질의 발현에 대하여 시험하였는데, 이는 제조자의 지시에 따른 것이다.

[0286] 재조합 클론으로 BLR(DE3)의 적격 세포를 형질전환시키고, 이를 암피실린 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 포함하는 LB 한천 상에 도말하였다. 실시예 17에 설명한 바와 같이 몇 개의 클론을 고르고 단백질 발현에 대하여 분석하였다. 유도된 세포는 기대되는 분자량의 재조합 단백질의 보다 우수한 발현을 37°C에서보다 15°C에서 나타내었다.

[0287] 본 명세서에 인용된 모든 특허, 특허 출원, 및 간행물과, 전자적으로 입수가 가능한 자료 (예를 들어, 젠뱅크 및 RefSeq에서의 뉴클레오티드 서열 추출물, 및 예를 들어 SwissProt, PIR, PRF, PDB에서의 아미노산 서열 추출물, 및 젠뱅크 및 RefSeq에서 주석을 단 코딩 영역으로부터의 번역을 예컨대 포함함)의 전 개시 내용이 참고로 포함된다. 본 출원의 개시 내용과 본 명세서에 참고로 포함된 임의의 문서의 개시 내용(들) 사이에 임의의 모순이 존재하는 경우, 본 출원의 개시 내용이 좌우할 것이다. 전술한 상세한 설명 및 예는 단지 이해를 명확히 하기 위해 주어진 것이다. 그로부터 어떠한 불필요한 제한도 유추되어서는 안된다. 당업자에게 자명한 변화가 청구의 범위에 의해 한정되는 본 발명의 범주 내에 포함될 것이므로, 본 발명은 도시되고 설명된 정확한 상세 사항

으로 제한되지 않는다.

- [0288] 달리 나타내지 않는 한, 본 명세서 및 특허청구범위에서 사용되는 성분들의 양, 분자량 등을 표현하는 모든 수는 모든 경우 "약"이라는 용어로 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 달리 반대로 지시되지 않는 한, 명세서 및 특허청구범위에서 나타나는 파라미터 수치는 본 발명에 의해 수득하고자 하는 목적하는 특성에 따라 다양할 수 있는 근사치이다. 최소한, 그리고 특허청구범위의 범주와 등가인 이론을 한정하려는 시도로서는 아니면서, 각각의 파라미터 수치는 적어도 보고된 유효 자리수의 숫자 관점에서 그리고 보통의 반올림 기법에 의해 해석되어야 한다.
- [0289] 본 발명의 넓은 범주를 나타내는 수치적 범위 및 파라미터가 근사치임에도 불구하고, 특정 실시예에서 나타내지는 수치 값은 가능한 한 정확하게 보고된다. 그러나, 모든 수치 값은 본래, 이들 각각의 시험 측정에서 발견되는 표준 편차로 인해 필연적으로 생기는 범위를 포함한다.
- [0290] 모든 표제는 독자의 편리함을 위한 것이며, 그렇게 특정되지 않는 한 표제 이후의 본문의 의미를 한정하기 위하여 사용되어서는 안된다.

서열목록 자유텍스트

- [0292] 서열 번호 1 씨. 디피실레 균주 630의 가상 단백질 CD1021
- 서열 번호 2 가상 단백질 CD1021의 잔기 505-604
- 서열 번호 3 가상 단백질 CD1021의 잔기 203 내지 217
- 서열 번호 4 가상 단백질 CD1021의 잔기 333 내지 347
- 서열 번호 5 씨. 디피실레 630의 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제
- 서열 번호 6 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제의 잔기 294-393
- 서열 번호 7 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제의 잔기 582-596
- 서열 번호 8 추정 N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제의 잔기 64-78
- 서열 번호 9 가상 단백질 CD1021의 잔기 30-120
- 서열 번호 10 가상 단백질 CD1021의 잔기 194-293
- 서열 번호 11-12 씨. 디피실레 QCD-32g58의 게놈에서 코딩된 아미노산 서열
- 서열 번호 13-14 씨. 디피실레 QCD-32g58 유래의 게놈 서열
- 서열 번호 15 씨. 디피실레 QCD-66c26 유래의 게놈 서열
- 서열 번호 16-17 씨. 디피실레 균주 630의 게놈에서 코딩된 아미노산 서열
- 서열 번호 18-20 씨. 디피실레 QCD-32g58에서 코딩된 아미노산 서열
- 서열 번호 21 씨. 디피실레 QCD-32g58의 번역된 아미노산 서열
- 서열 번호 22 씨. 디피실레 QCD-32g58 게놈 서열의 번역된 아미노산 서열
- 서열 번호 23 씨. 디피실레 QCD-66c26의 번역된 아미노산 서열
- 서열 번호 24-37 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머
- 서열 번호 38 컨센서스 서열
- 서열 번호 39-44 씨. 디피실레 ATCC 9689 유래의 게놈 서열
- 서열 번호 45-50 씨. 디피실레 ATCC 9689의 번역된 아미노산 서열

도면

도면1a

SEQ ID NO.:	
1	1 MKDKKFTLLISIMIVFLCAVVGYSTSSNKSVDLYSDVYIEKYFNDRDKVMEVNIETDESCLKDMNENAIKEEFKAKVTVDGDYGNVGIRTKGNSSLSVANSSDRYSYKINFDPKYNT
23	1 MKDKKFTLLISIMIIIFLCAVVGYSTSSNKSVDLYSDVYIEKYFNDRDKVMEVNIETDESCLKDMNENAIKEEFKAKVTVDGDYGNVGIRTKGNSSLSVANSSDRYSYKINFDPKYNT
21	1 .KIKKFTLLISIMIIIFLCAVVGYSTSSNKSVDLYSDVYIEKYFNDRDKVMEVNIETDESCLKDMNENAIKEEFKAKVTVDGDYGNVGIRTKGNSSLSVANSSDRYSYKINFDPKYNT
11	1MIIFLCAVVGYSTSSNKSVDLYSDVYIEKYFNDRDKVMEVNIETDESCLKDMNENAIKEEFKAKVTVDGDYGNVGIRTKGNSSLSVANSSDRYSYKINFDPKYNT
12	1
22	1
Consensus	1 XXXXXXXXXXXXXMIXFLCAVVGYSTSSNKSVDLYSDVYIEKYFNDRDKVMEVNIETDESCLKDMNENAIKEEFKAKVTVDGDYGNVGIRTKGNSSLSVANSSDRYSYKINFDPKYNT
1	121 SQSMEGLTQLNLNCCYSDPSYMRFLTYSICEEMGLATPEFAYAKVSINGEYHGLYLAVEGLKESYLENNFGNVTGDLKSDGSSSLQYKGGDPESYSLNIVESDKKTADWSKITKLKS
23	121 SQSMEGLTQLNLNCCYSDPSYMRFLTYSICEEMGLATPEFAYAKVSINGEYHGLYLAVEGLKESYLENNFGNVTGDLKSDGSSSLQYKGGDPESYSLNIVESDKKTADWSKITKLKS
21	120 SQSMEGLTQLNLNCCYSDPSYMRFLTYSICEEMGLATPEFAYAKVSINGEYHGLYLAVEGLKESYLENNFGNVTGDLKSDGSSSLQYKGGDPESYSLNIVESDKKTADWSKITKLKS
11	109 SQSMEGLTQLNLNCCYSDPSYMRFLTYSICEEMGLATPEFAYAKVSINGEYHGLYLAVEGLKESYLENNFGNVTGDLKSDGSSSLQYKGGDPESYSLNIVESDKKTADWSKITKLKS
12	1
22	1
Consensus	107 SQSMEGLTQLNLNCCYSDPSYMRFLTYSICEEMGLATPEFAYAKVSINGEYHGLYLAVEGLKESYLENNFGNVTGDLKSDGSSSLQYKGGDPESYSLNIVESDKKTADWSKITKLKS
1	241 LDTGEDIEKYLVDVSLKNAINTALLNLDYQGSFAHNYLYEQDGVFSLPWFNMSFGGFSFGGGSQSIAIDPTTGNLEDRPLISSLLKNETYKTKYHKYLEEIVTKYLDSDYLE
23	241 LDTGEDIEKYLVDVSLKNAINTALLNLDYQGSFAHNYLYEQDGVFSLPWFNMSFGGFSFGGGSQSIAIDPTTGNLEDRPLISSLLKNETYKTKYHKYLEEIVTKYLDSDYLE
21	240 LDTGEDIEKYLVDVSLKNAINTALLNLDYQGSFAHNYLYEQDGVFSLPWFNMSFGGFSFGGGSQSIAIDPTTGNLEDRPLISSLLK.....
11	229 LDTGEDIEKYLVDVSLKNAINTALLNLDYQGSFAHNYLYEQDGVFSLPWFNMSFGGFSFGGGSQSIAIDPTTGNLEDRPLISSLLK.....
12	1
22	1
Consensus	227 LDTGEDIEKYLVDVSLKNAINTALLNLDYQGSFAHNYLYEQDGVFSLPWFNMSFGGFSFGGGSQSIAIDPTTGNLEDRPLISSLLKNETYKTKYHKYLEEIVTKYLDSDYLE



도면1b



1	361 NMTTKLHDMIASYVKEDPTAFYTYEEFEKNI TSSIEDSSDNKGFGNKGFDNNNSNNSDSNNNSNSENKRSQNSDKKEVNAELTSSVVKANTDNENKTNDSESKNNTDKDKSGNDNN
23	361 NMTTKLHDMIASYVKEDPTAFYTYEEFEKNI TSSIEDSSDNKGFGNKGFDNNNSNNSDSNNNSNSENKRSQNSDKKEVNAELTSSVVKANTDNENKTNDSESKNNTDKDKSGNDNN
21
11
12	1 .MNTTKLHDMIASYVKEDPTAFYTYEEFEKNI TSSIEDSSDNKGFGNKGFDNNNSNNSDSNNNSNSENKRSQNSDKKEVNAELTSSVVKANTDNENKTNDSESKNNTDKDKSGNDNN
22	28 NMTTKLHDMIASYVKEDPTAFYTYEEFEKNI TSSIEDSSDNKGFGNKGFDNNNSNNSDSNNNSNSENKRSQNSDKKEVNAELTSSVVKANTDNENKTNDSESKNNTDKDKSGNDNN
Consensus	321 NMTTKLHDMIASYVKEDPTAFYTYEEFEKNI TSSIEDSSDNKGFGNKGFDNNNSNNSDSNNNSNSENKRSQNSDKKEVNAELTSSVVKANTDNENKTNDSESKNNTDKDKSGNDNN
1	481 QKLEGPGRGKGSIPGVLEVAEDMSKTIKSQLSGETSSSTKQNSGDESSSGIKGSEKFDDEMSGMPPEPPGMDGKMPGGMNMDKGMNGKNGNMMDRQDNPREAGGPGNRGGGSVSKT
23	481 QKLEGPGRGKGSIPGVLEVAEDMSKTIKSQLSGETSSSTKQNSGDESSSGIKGSEKFDDEMSGMPPEPPGMDGKMPGGMNMDKGMNGKNGNMMDRQDNPREAGGPGNRGGGSVSKT
21
11
12	120 QKLEGPGRGKGSIPGVLEVAEDMSKTIKSQLSGETSSSTKQNSGDESSSGIKGSEKFDDEMSGMPPEPPGMDGKMPGGMNMDKGMNGKNGNMMDRQDNPREAGGPGNRGGGSVSKT
22	148 QKLEGPGRGKGSIPGVLEVAEDMSKTIKSQLSGETSSSTKQNSGDESSSGIKGSEKFDDEMSGMPPEPPGMDGKMPGGMNMDKGMNGKNGNMMDRQDNPREAGGPGNRGGGSVSKT
Consensus	440 QKLEGPGRGKGSIPGVLEVAEDMSKTIKSQLSGETSSSTKQNSGDESSSGIKGSEKFDDEMSGMPPEPPGMDGKMPGGMNMDKGMNGKNGNMMDRQDNPREAGGPGNRGGGSVSKT
1	601 TTYFKLILGGASMI IMSIMLVGVSrvKRRRFIKSK
23	601 TTYFKLILGGASMI IMSIMLVGVSrvKRRRFIKSK
21
11
12	240 TTYFKLILGGASMI IMSIMLVGVSrvKRRRFIKSK
22	258 TTYFKLILGGASMI IMSIMLVGVSrvKRRRFIKSK
Consensus	560 TTYFKLILGGASMI IMSIMLVGVSrvKRRRFIKSK

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> 3M Innovative Properties Company

Rajagopal, Raj

Wei, Ai-Ping

<120> ANTIBODIES TO CLOSTRIDIUM DIFFICILE SPORES AND USES THEREOF

<130> 63842W0003

<150> US 61/032270

<151> 2008-02-28

<160> 50

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 635

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 1

Met Lys Asp Lys Lys Phe Thr Leu Leu Ile Ser Ile Met Ile Val Phe

1 5 10 15

Leu Cys Ala Val Val Gly Val Tyr Ser Thr Ser Ser Asn Lys Ser Val

20 25 30

Asp Leu Tyr Ser Asp Val Tyr Ile Glu Lys Tyr Phe Asn Arg Asp Lys

35 40 45

Val Met Glu Val Asn Ile Glu Ile Asp Glu Ser Asp Leu Lys Asp Met

50 55 60

Asn Glu Asn Ala Ile Lys Glu Glu Phe Lys Val Ala Lys Val Thr Val

65 70 75 80

Asp Gly Asp Thr Tyr Gly Asn Val Gly Ile Arg Thr Lys Gly Asn Ser

85 90 95

Ser Leu Ile Ser Val Ala Asn Ser Asp Ser Asp Arg Tyr Ser Tyr Lys

100 105 110

Ile Asn Phe Asp Lys Tyr Asn Thr Ser Gln Ser Met Glu Gly Leu Thr

115 120 125

Gln Leu Asn Leu Asn Asn Cys Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Met Arg Glu

130 135 140

Phe Leu Thr Tyr Ser Ile Cys Glu Glu Met Gly Leu Ala Thr Pro Glu

145 150 155 160

Phe Ala Tyr Ala Lys Val Ser Ile Asn Gly Glu Tyr His Gly Leu Tyr

165 170 175

Leu Ala Val Glu Gly Leu Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Asn Asn Phe Gly

180	185	190
Asn Val Thr Gly Asp Leu Tyr Lys Ser Asp Glu Gly Ser Ser Leu Gln		
195	200	205
Tyr Lys Gly Asp Asp Pro Glu Ser Tyr Ser Asn Leu Ile Val Glu Ser		
210	215	220
Asp Lys Lys Thr Ala Asp Trp Ser Lys Ile Thr Lys Leu Leu Lys Ser		
225	230	235
240		
Leu Asp Thr Gly Glu Asp Ile Glu Lys Tyr Leu Asp Val Asp Ser Val		
245	250	255
Leu Lys Asn Ile Ala Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Leu Asp Ser Tyr		
260	265	270
Gln Gly Ser Phe Ala His Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Gln Asp Gly Val		
275	280	285
Phe Ser Met Leu Pro Trp Asp Phe Asn Met Ser Phe Gly Gly Phe Ser		
290	295	300
Gly Phe Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ile Ala Ile Asp Glu Pro Thr Thr		
305	310	315
320		
Gly Asn Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ile Ser Ser Leu Leu Lys Asn Glu		
325	330	335
Thr Tyr Lys Thr Lys Tyr His Lys Tyr Leu Glu Glu Ile Val Thr Lys		
340	345	350
Tyr Leu Asp Ser Asp Tyr Leu Glu Asn Met Thr Thr Lys Leu His Asp		
355	360	365
Met Ile Ala Ser Tyr Val Lys Glu Asp Pro Thr Ala Phe Tyr Thr Tyr		
370	375	380
Glu Glu Phe Glu Lys Asn Ile Thr Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Asp		
385	390	395
400		
Asn Lys Gly Phe Gly Asn Lys Gly Phe Asp Asn Asn Asn Ser Asn Asn		
405	410	415
Ser Asp Ser Asn Asn Asn Ser Asn Ser Glu Asn Lys Arg Ser Gly Asn		
420	425	430

Gln Ser Asp Glu Lys Glu Val Asn Ala Glu Leu Thr Ser Ser Val Val
435 440 445

Lys Ala Asn Thr Asp Asn Glu Thr Lys Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ser
450 455 460

Glu Ser Lys Asn Asn Thr Asp Lys Asp Lys Ser Gly Asn Asp Asn Asn
465 470 475 480

Gln Lys Leu Glu Gly Pro Met Gly Lys Gly Gly Lys Ser Ile Pro Gly
485 490 495

Val Leu Glu Val Ala Glu Asp Met Ser Lys Thr Ile Lys Ser Gln Leu
500 505 510

Ser Gly Glu Thr Ser Ser Thr Lys Gln Asn Ser Gly Asp Glu Ser Ser
515 520 525

Ser Gly Ile Lys Gly Ser Glu Lys Phe Asp Glu Asp Met Ser Gly Met
530 535 540

Pro Glu Pro Pro Glu Gly Met Asp Gly Lys Met Pro Pro Gly Met Gly
545 550 555 560

Asn Met Asp Lys Gly Asp Met Asn Gly Lys Asn Gly Asn Met Asn Met
565 570 575

Asp Arg Asn Gln Asp Asn Pro Arg Glu Ala Gly Gly Phe Gly Asn Arg
580 585 590

Gly Gly Gly Ser Val Ser Lys Thr Thr Thr Tyr Phe Lys Leu Ile Leu
595 600 605

Gly Gly Ala Ser Met Ile Ile Met Ser Ile Met Leu Val Gly Val Ser
610 615 620

Arg Val Lys Arg Arg Arg Phe Ile Lys Ser Lys
625 630 635

<210> 2

<211> 100

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 2

Ser Lys Thr Ile Lys Ser Gln Leu Ser Gly Glu Thr Ser Ser Thr Lys

1 5 10 15

Gln Asn Ser Gly Asp Glu Ser Ser Ser Gly Ile Lys Gly Ser Glu Lys

20 25 30

Phe Asp Glu Asp Met Ser Gly Met Pro Glu Pro Pro Glu Gly Met Asp

35 40 45

Gly Lys Met Pro Pro Gly Met Gly Asn Met Asp Lys Gly Asp Met Asn

50 55 60

Gly Lys Asn Gly Asn Met Asn Met Asp Arg Asn Gln Asp Asn Pro Arg

65 70 75 80

Glu Ala Gly Gly Phe Gly Asn Arg Gly Gly Gly Ser Val Ser Lys Thr

85 90 95

Thr Thr Tyr Phe

100

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 3

Glu Gly Ser Ser Leu Gln Tyr Lys Gly Asp Asp Pro Glu Ser Tyr

1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 4

Leu Lys Asn Glu Thr Tyr Lys Thr Lys Tyr His Lys Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 5

<211> 677

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 5

Met Leu Ser Lys Glu Ile Asn Met Arg Arg Asn Thr Lys Leu Leu Thr
1 5 10 15
Thr Gly Ile Leu Ser Met Ala Ile Val Ala Pro Thr Met Ala Phe Ala
 20 25 30
Thr Glu Ser Asn Ala Met Glu Asn Asn Ala Asp Leu Asn Ile Asn Leu
 35 40 45
Glu Lys Lys Ser Ile Val Leu Gly Ser Lys Ser Lys Val Ser Val Lys

 50 55 60
Phe Lys Glu Lys Pro Asp Ala Asp Ser Ile Lys Leu Lys Tyr Lys Cys
65 70 75 80
Tyr Asp Met Pro Leu Asn Thr Thr Leu Asn Tyr Asn Gln Ser Thr Gly
 85 90 95
Ala Tyr Glu Gly Ile Ile Asn Tyr Asn Lys Asp Pro Glu Tyr Leu Asn
 100 105 110
Val Trp Glu Leu Gln Gly Ile Thr Ile Asn Ser Lys Thr Asn Pro Lys

 115 120 125
Thr Leu Asn Arg Gln Asp Leu Glu Lys Met Gly Leu Asn Leu Lys Asp
 130 135 140
Tyr Asn Val Thr Gln Glu Cys Ile Ile Glu Asp Ile Thr Ser Arg Lys
145 150 155 160
Asp Val Asn Lys Tyr Leu Arg Lys Thr Ser Ser Pro Ile Thr Glu Leu
 165 170 175
Thr Gly Ser Asp Arg Tyr Glu Thr Ala Val Lys Ile Ser Lys Glu Gly

 180 185 190
Trp Lys Asn Gly Ser Asp Lys Val Val Ile Ile Asn Gly Asp Val Ser
 195 200 205
Ile Asp Gly Ile Ile Ser Thr Pro Leu Ala Thr Thr Tyr Asn Ala Pro
 210 215 220
Ile Leu Leu Val Glu Lys Asn Asn Val Pro Asn Ser Val Lys Ser Glu
225 230 235 240
Leu Lys Arg Leu Asn Pro Lys Asp Ile Ile Ile Ile Gly Asp Glu Asn

245 250 255
 Ala Ile Ser Lys Thr Thr Ala Asn Gln Ile Lys Ser Thr Val Asn Ala
 260 265 270
 Ser Gln Thr Arg Leu Asn Gly Ser Asn Arg Tyr Glu Thr Ser Leu Leu
 275 280 285
 Ile Ala Lys Glu Ile Asp Lys Asn His Asp Val Glu Lys Val Tyr Ile
 290 295 300
 Thr Asn Ala Asn Gly Gly Glu Val Asp Ala Leu Thr Ile Ala Ala Lys

 305 310 315 320
 Ala Gly Gln Asp Lys Gln Pro Ile Ile Leu Thr Asp Lys Asp Ser Ile
 325 330 335
 Thr Asp Asn Thr Tyr Lys Trp Leu Lys Ser Glu Asp Leu Gln Asn Ala
 340 345 350
 Tyr Phe Ile Gly Gly Pro Gln Met Ile Ser Thr Asn Val Ile Asn Lys
 355 360 365
 Val Asn Gly Ile Thr Lys Asp Ser Val Thr Asn Asn Arg Val Tyr Gly

 370 375 380
 Ala Asp Arg His Glu Thr Asn Ala Asn Val Ile Lys Lys Phe Tyr Thr
 385 390 395 400
 Asp Asp Glu Leu Glu Ala Val Leu Val Ala Lys Ser Asp Val Leu Val
 405 410 415
 Asp Ala Leu Ala Ala Gly Pro Leu Ala Ala Asn Leu Lys Ser Pro Ile
 420 425 430
 Leu Ile Thr Pro Lys Thr Tyr Val Ser Ala Tyr His Lys Asp Asn Leu

 435 440 445
 Glu Ala Lys Ser Ala Asn Lys Val Tyr Lys Ile Gly Gly Gly Leu Thr
 450 455 460
 Ser Lys Val Met Ser Ser Ile Ala Ser Ser Leu Ser Lys His Asn Thr
 465 470 475 480
 Thr Pro Thr Glu Pro Gly Asn Ser Gly Gly Lys Thr Val Met Ile Asp
 485 490 495

Pro Gly His Gly Gly Ser Ala Pro Gly Asn Ser Ser Gly Gly Met Ile

500 505 510

Glu Lys Asp Tyr Asn Leu Asn Thr Ser Leu Ala Thr Thr Glu Tyr Leu

515 520 525

Arg Ser Lys Gly Phe Asn Val Ile Met Thr Arg Asp Thr Asp Lys Thr

530 535 540

Leu Ser Leu Gly Asn Arg Thr Ala Leu Ser Asn Ser Leu Lys Pro Asp

545 550 555 560

Leu Phe Thr Ser Ile His Tyr Asn Gly Ser Thr Asn Lys Gln Gly His

565 570 575

Gly Val Glu Val Phe Tyr Lys Leu Lys Asp Lys Asn Gly Gly Thr Thr

580 585 590

Lys Thr Val Ala Thr Asn Ile Leu Asn Arg Ile Leu Glu Lys Phe Lys

595 600 605

Leu Thr Asn Arg Gly Ile Lys Thr Arg Val Leu Pro Ser Asp Ser Thr

610 615 620

Lys Asp Tyr Leu Tyr Val Leu Arg Ser Asn Asp Met Pro Ala Val Leu

625 630 635 640

Val Glu Cys Ala Phe Leu Asp Asn Glu Asn Asp Met Ser Leu Ile Asn

645 650 655

Ser Ser Ala Lys Val Lys Glu Met Gly Thr Gln Ile Gly Lys Gly Ile

660 665 670

Glu Asp Ser Leu Lys

675

<210> 6

<211> 99

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 6

Asp Lys Asn His Asp Val Glu Lys Val Tyr Ile Thr Asn Ala Asn Gly

1 5 10 15

Gly Glu Val Asp Ala Leu Thr Ile Ala Ala Lys Ala Gly Gln Asp Lys
 20 25 30
 Gln Pro Ile Ile Leu Thr Asp Lys Asp Ser Ile Thr Asp Asn Tyr Lys
 35 40 45
 Trp Leu Lys Ser Glu Asp Leu Gln Asn Ala Tyr Phe Ile Gly Gly Pro
 50 55 60
 Gln Met Ile Ser Thr Asn Val Ile Asn Lys Val Asn Gly Ile Thr Lys

65 70 75 80
 Asp Ser Val Thr Asn Asn Arg Val Tyr Gly Ala Asp Arg His Glu Thr
 85 90 95
 Asn Ala Asn

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 7

Tyr Lys Leu Lys Asp Lys Asn Gly Gly Thr Thr Lys Thr Val Ala
 1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 8

Lys Phe Lys Glu Lys Pro Asp Ala Asp Ser Ile Lys Leu Lys Tyr

1 5 10 15

<210> 9

<211> 91

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 9

Lys Ser Val Asp Leu Tyr Ser Asp Val Tyr Ile Glu Lys Tyr Phe Asn
 1 5 10 15

Arg Asp Lys Val Met Glu Val Asn Ile Glu Ile Asp Glu Ser Asp Leu
20 25 30

Lys Asp Met Asn Glu Asn Ala Ile Lys Glu Glu Phe Lys Val Ala Lys
35 40 45

Val Thr Val Asp Gly Asp Thr Tyr Gly Asn Val Gly Ile Arg Thr Lys
50 55 60

Gly Asn Ser Ser Leu Ile Ser Val Ala Asn Ser Asp Ser Asp Arg Tyr
65 70 75 80

Ser Tyr Lys Ile Asn Phe Asp Lys Tyr Asn Thr
85 90

<210> 10

<211> 100

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 10

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

Lys Gly Asp Asp Pro Glu Ser Tyr Ser Asn Leu Ile Val Glu Ser Asp
20 25 30

Lys Lys Thr Ala Asp Trp Ser Lys Ile Thr Lys Leu Leu Lys Ser Leu
35 40 45

Asp Thr Gly Glu Asp Ile Glu Lys Tyr Leu Asp Val Asp Ser Val Leu
50 55 60

Lys Asn Ile Ala Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Leu Asp Ser Tyr Gln
65 70 75 80

Gly Ser Phe Ala His Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Gln Asp Gly Val Phe
85 90 95

Ser Met Leu Pro
100

<210> 11

<211> 323

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 11

Met Ile Ile Phe Leu Cys Ala Val Val Gly Val Tyr Ser Thr Ser Ser

1 5 10 15

Asn Lys Ser Val Asp Leu Tyr Ser Asp Val Tyr Ile Glu Lys Tyr Phe

20 25 30

Asn Arg Asp Lys Val Met Glu Val Asn Ile Glu Ile Asp Glu Ser Asp

35 40 45

Leu Lys Asp Met Asn Glu Asn Ala Ile Lys Glu Glu Phe Lys Val Ala

50 55 60

Lys Val Thr Val Asp Gly Asp Thr Tyr Gly Asn Val Gly Ile Arg Thr

65 70 75 80

Lys Gly Asn Ser Ser Leu Thr Ser Val Ala Asn Ser Asp Ser Asp Arg

85 90 95

Tyr Ser Tyr Lys Ile Asn Phe Asp Lys Tyr Asn Thr Ser Gln Ser Met

100 105 110

Glu Gly Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asn Asn Cys Tyr Ser Asp Pro Ser

115 120 125

Tyr Met Arg Glu Phe Leu Thr Tyr Ser Ile Cys Glu Glu Met Gly Leu

130 135 140

Ala Thr Pro Glu Phe Ala Tyr Ala Lys Val Ser Ile Asn Gly Glu Tyr

145 150 155 160

His Gly Leu Tyr Leu Ala Val Glu Gly Leu Lys Glu Ser Tyr Leu Glu

165 170 175

Asn Asn Phe Gly Asn Val Thr Gly Asp Leu Tyr Lys Ser Asp Glu Gly

180 185 190

Ser Ser Leu Gln Tyr Lys Gly Asp Asp Pro Glu Ser Tyr Ser Asn Leu

195 200 205

Ile Val Glu Ser Asp Lys Lys Thr Ala Asp Trp Ser Lys Ile Thr Lys

210 215 220

Leu Leu Lys Ser Leu Asp Thr Gly Glu Asp Ile Glu Lys Tyr Leu Asp

225 230 235 240
 Val Asp Ser Val Leu Lys Asn Ile Ala Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn
 245 250 255
 Leu Asp Ser Tyr Gln Gly Ser Phe Ala His Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu
 260 265 270
 Gln Asp Gly Val Phe Ser Met Leu Pro Trp Asp Phe Asn Met Ser Phe
 275 280 285

 Gly Gly Phe Ser Gly Phe Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ile Ala Ile Asp
 290 295 300
 Glu Pro Thr Thr Gly Asn Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ile Ser Ser Leu
 305 310 315 320
 Leu Lys Lys

 <210> 12
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> Clostridium difficile
 <400> 12
 Met Thr Thr Lys Leu His Asp Met Ile Ala Ser Tyr Val Lys Glu Asp
 1 5 10 15
 Pro Thr Ala Phe Tyr Thr Tyr Glu Glu Phe Glu Lys Asn Ile Thr Ser

 20 25 30
 Ser Ile Glu Asp Ser Ser Asp Asn Lys Gly Phe Gly Asn Lys Gly Phe
 35 40 45
 Asp Asn Asn Asn Ser Asn Asn Ser Asp Ser Asn Asn Asn Ser Asn Ser
 50 55 60
 Glu Asn Lys Arg Ser Gly Asn Gln Ser Asp Lys Lys Glu Val Asn Ala
 65 70 75 80
 Glu Leu Thr Ser Ser Val Val Lys Thr Asn Thr Asp Asn Glu Thr Glu

 85 90 95
 Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ser Glu Ser Lys Asn Asn Thr Asp Lys Asp
 100 105 110

Lys Ser Gly Asn Asp Asn Asn Gln Lys Leu Glu Gly Pro Arg Gly Lys
115 120 125
Gly Gly Lys Ser Ile Pro Gly Val Leu Glu Val Ala Glu Asp Met Ser
130 135 140
Lys Thr Ile Lys Ser Gln Leu Ser Gly Glu Thr Ser Ser Thr Lys Gln
145 150 155 160
Asn Ser Gly Asp Glu Ser Ser Ser Gly Ile Lys Gly Ser Glu Lys Phe
165 170 175
Asp Glu Asp Met Ser Gly Met Pro Glu Pro Pro Glu Gly Met Asp Gly
180 185 190
Lys Met Pro Pro Gly Met Gly Asn Met Asp Lys Gly Asp Met Asn Gly
195 200 205
Lys Asn Gly Asn Met Asn Met Asp Arg Asn Gln Asp Asn Pro Arg Glu
210 215 220
Ala Gly Gly Phe Gly Asn Arg Gly Gly Gly Ser Val Ser Lys Thr Thr
225 230 235 240
Thr Tyr Phe Lys Leu Ile Leu Gly Gly Ala Ser Met Ile Ile Met Ser
245 250 255
Ile Met Leu Val Gly Val Ser Arg Val Lys Arg Arg Arg Phe Ile Lys
260 265 270
Ser Lys

<210> 13

<211> 999

<212>

> DNA

<213> Clostridium difficile

<400> 13

aagataaaaa aatttaccct tcttatctct attatgatta tatttttatg tgctgtagtt	60
ggagtttata gtacatctag caacaaaagt gttgatttat atagtgatgt atatttgaa	120
aaatatttta acagagacaa ggttatggaa gttaatatag agatagatga aagtgacttg	180
aaggatatga atgaaaatgc tataaaagaa gaatttaagg ttgcaaaagt aactgtagat	240
ggagatacat atggaaacgt aggtataaga actaaaggaa attcaagtct tacatctgta	300

gcaaatagtg atagtgatag atacagctat aagattaatt ttgataagta taatactagt 360

caaagtatgg aagggttac tcaattaaat cttataaact gttactctga cccatcttat 420

atgagagagt ttttaacata tagtatgtgc gaggaaatgg gattagcgac tccagaattt 480

gcatatgcta aagtctctat aaatggcgaa tatcatggtt tgtatttggc agtagaagga 540

ttaaaagagt cttatcttga aaataatttt ggtaatgtaa ctggagactt atataagtca 600

gatgaaggaa gctcgttgca atataaagga gatgaccag aaagtactc aaacttaatc 660

gttgaaagt ataaaaagac agctgattgg tctaaaatta caaaactatt aaaatctttg 720

gatacaggtg aagatatga aaaatatctt gatgtagatt ctgtccttaa aaatatagca 780

ataaatacag ctttatataa ccttgatagc tatcaaggca gttttgccca taactattat 840

ttatatgagc aagatggagt attttctatg ttacatggg attttaatat gtcatttgg 900

ggatttagtg gttttgggtg aggtagtcaa tctatagcaa ttgatgaacc tacgacaggt 960

aatttagaag acagacctc cctatcctcg ttattaaaa 999

<210> 14

<211> 909

<212> DNA

<213> Clostridium difficile

<400> 14

aaaaatgaga cacacaaaac aaaataccat aaatatctgg aagagatagt aacaaaatac 60

ctagattcag actattttaga gaatatgaca acaaaattgc atgacatgat agcatcatat 120

gtaaaagaag acccaacagc attttatact tatgaagaat ttgaaaaaaa tataacatct 180

tcaattgaag attctagtga taataaggga tttggttaata aagggtttga caacaataac 240

tctaataaca gtgattctaa taataattct aatagtgaaa ataagcgctc tggaaatcaa 300

agtgataaaa aagaagttaa tgctgaatta acatcaagcg tagtcaaac taatacagat 360

aatgaaactg aaaataaaac tacaatgat agcgaaagta agaataatac agataaagat 420

aaaagtggaa atgataataa tcaaaagcta gaaggctcta ggggtaaagg aggtaagtca 480

ataccagggg ttttgaagt tgcagaagat atgagtaaaa ctataaaatc tcaattaagt 540

ggagaaactt cttcgacaaa gcaaaactct ggtgatgaaa gttcaagtgg aattaaaggt 600

agtgaagaat ttgatgagga tatgagtggg atccagaac cacctgaggg aatggatgg 660

aaaatgccac caggaatggg taatatggat aaggagata tgaatggtaa aaatggcaat 720

atgaatatgg atagaaatca agataatcca agagaagctg gaggttttgg caatagagga 780

ggaggctctg tgagtaaaac aacaacatac ttcaaatata ttttaggtgg agcttcaatg 840

ataataatgt cgattatgtt agtaggtgia tcaagggtaa agagaagaag atttataaag	900
tcaaaataa	909
<210> 15	
<211> 1907	
<212> DNA	
<213> Clostridium difficile	
<400> 15	
atgaaagata aaaaatttac cttctttatc tctattatga ttatatTTTT atgtgctgta	60
ttggagttta tagtacatct agcaacaaaa gtgttgattt atatagtgat gtatatattg	120
aaaaatattt taacagagac aaggttatgg aagttaatat agagatagat gaaagtgact	180
tgaaggatat gaatgaaaa gctataaaaag aagaatttaa ggttgcaaaa gtaactgtag	240
atggagatac atatggaaac gtaggtataa gaactaaagg aaattcaagt cttacatctg	300
tagcaaatag tgatagtgat agatacagct ataagattaa ttttgataag tataatacta	360
gtcaaagtat ggaagggtct actcaattaa atcttaataa ctgttactct gacctatctt	420
atatgagaga gtttttaaca tatagtattt gcgaggaaat gggattagcg actccagaat	480
ttgcatatgc taaagtctct ataaatggcg aatatcatgg tttgtatttg gcagtagaag	540
gattaaaaga gtcttatctt gaaaataatt ttggtaatgt aactggagac ttatataagt	600
cagatgaagg aagctcgttg caatataaag gagatgacct agaaagttac tcaaaactta	660
tcgttgaaag tgataaaaag acagctgatt ggtctaaaat tacaaaacta ttaaaatctt	720
tggatacagg tgaagatatt gaaaaatatac ttgatgtaga ttctgtcctt aaaaatatag	780
caataaatac agctttatta aaccttgata gctatcaagg cagttttgcc cataactatt	840
atttatatga gcaagatgga gtattttcta tgttaccatg ggattttaat atgtcatttg	900
gtggatttag tggttttggt ggaggtatgc aatctatagc aattgatgaa cctacgacag	960
gtaatttaga agacagacct ctcatatcct cgttattaaa aatgagaca cacaaaacaa	1020
aataccataa atatctggaa gagatagtaa caaaatacct agattcagac tatttagaga	1080
atatgacaac aaaattgcat gacatgatag catcatatgt aaaagaagac ccaacagcat	1140
tttatactta tgaagaattt gaaaaaata taacatcttc aattgaagat tctagtgata	1200
ataagggtat ttgtaataaa gggtttgaca acaataactc taataacagt gattcttaata	1260
ataattctaa tagtgaaaat aagcgtcttg gaaatcaaag tgataaaaaa gaagttaatg	1320
ctgaattaac atcaagcgta gtcaaaacta atacagataa tgaaactgaa aataaaacta	1380
caaatgatag cgaaagtaag aataatacag ataaagataa aagtggaaat gataataatc	1440

aaaagctaga aggtcctagg ggtaaaggag gtaagtcaat accaggggtt ttggaagttg 1500
cagaagatat gagtaaaact ataaaatctc aattaagtgg agaaacttct tcgacaaagc 1560
aaaactctgg tgatgaaagt tcaagtggaa ttaaaggtag tgaaaagttt gatgaggata 1620

tgagtggat gccagaacca cctgagggaa tggatggtaa aatgccacca ggaatgggta 1680
atatggataa gggagatatg aatggtaaaa atggcaatat gaatatggat agaaatcaag 1740
ataatccaag agaagctgga gggttttgca atagaggagg aggcctctgtg agtaaaacaa 1800
caacatactt caaattaatt ttaggtggag cttcaatgat aataatgtcg attatgttag 1860
taggtgtatc aagggtaaag agaagaagat ttataagtc aaaataa 1907

<210> 16

<211> 679

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 16

Met Leu Ser Lys Glu Ile Asn Met Arg Arg Asn Thr Lys Leu Leu Thr

1 5 10 15
Thr Gly Ile Leu Ser Met Ala Ile Val Thr Pro Thr Met Ala Phe Ala
20 25 30
Thr Glu Ser Asn Ala Met Glu Asn Asn Ala Asp Leu Asn Ile Asn Leu
35 40 45
Glu Lys Lys Ser Ile Val Leu Gly Ser Thr Ser Lys Val Ser Val Lys
50 55 60
Phe Lys Glu Lys Pro Asp Ala Asp Ser Ile Thr Leu Lys Tyr Lys Cys

65 70 75 80
Tyr Asp Met Pro Leu Asp Thr Thr Leu Asn Tyr Asn Gln Ser Thr Glu
85 90 95
Ser Tyr Glu Gly Thr Ile Asn Tyr Asn Lys Asp Pro Glu Tyr Leu Asn
100 105 110
Val Trp Glu Leu Gln Gly Ile Thr Ile Asn Ser Lys Asn Asn Pro Lys
115 120 125
Thr Leu Asn Lys Gln Glu Leu Glu Lys Met Gly Leu Asn Leu Lys Asp

130

135

140

Tyr Asn Val Thr Gln Glu Cys Ile Ile Glu Asp Ile Thr Ser Arg Lys
 145 150 155 160
 Asp Val Asn Lys Tyr Leu Arg Lys Thr Ser Ala Pro Ile Thr Glu Leu
 165 170 175
 Thr Gly Ser Asp Arg Tyr Glu Thr Ala Val Lys Ile Ser Lys Glu Gly
 180 185 190
 Trp Lys Asn Gly Ser Asp Lys Val Val Ile Ile Asn Gly Asp Val Ser

 195 200 205
 Ile Asp Gly Ile Ile Ser Thr Pro Leu Ala Thr Thr Tyr Asn Ala Pro
 210 215 220
 Ile Leu Leu Val Glu Lys Asn Asn Val Pro Asn Ser Val Lys Ser Glu
 225 230 235 240
 Leu Lys Arg Leu Asn Pro Arg Asp Val Ile Ile Ile Gly Asp Glu Asn
 245 250 255
 Ala Ile Ser Lys Thr Thr Ala Asn Gln Ile Lys Ser Thr Val Asn Ala

 260 265 270
 Ser Gln Thr Arg Leu Lys Gly Ser Asn Arg Tyr Glu Thr Ser Leu Leu
 275 280 285
 Ile Ala Lys Glu Ile Asp Lys Asn His Asp Val Glu Lys Val Tyr Ile
 290 295 300
 Thr Asn Ala Asn Gly Gly Glu Val Asp Ala Leu Thr Ile Ala Ala Lys
 305 310 315 320
 Ala Gly Gln Asp Lys Gln Pro Ile Ile Leu Thr Asp Lys Asn Ser Ile

 325 330 335
 Thr Asp Asn Thr Tyr Lys Trp Leu Lys Ser Glu Asp Leu Gln Asn Ala
 340 345 350
 Tyr Phe Ile Gly Gly Pro Gln Met Ile Ser Thr Asn Val Ile Asn Lys
 355 360 365
 Val Asn Asp Ile Thr Lys Asp Asn Val Thr Asn Asn Arg Val Tyr Gly
 370 375 380
 Ala Asp Arg His Glu Thr Asn Ala Asn Val Ile Lys Lys Phe Tyr Thr

385 390 395 400
 Asp Asp Glu Leu Glu Ala Val Leu Val Ala Lys Ser Asp Val Leu Val
 405 410 415
 Asp Ala Leu Ala Ala Gly Pro Leu Ala Ala Asn Leu Lys Ser Pro Ile
 420 425 430
 Leu Ile Thr Pro Lys Thr Tyr Val Ser Ala Tyr His Lys Glu Asn Leu
 435 440 445
 Glu Ala Lys Ser Ala Asn Lys Val Tyr Lys Ile Gly Gly Gly Leu Thr

 450 455 460
 Ser Lys Val Met Ser Ser Ile Ala Ser Ser Leu Ser Lys His Asn Thr
 465 470 475 480
 Thr Pro Thr Glu Pro Gly Asn Ser Gly Gly Lys Thr Val Met Ile Asp
 485 490 495
 Pro Gly His Gly Gly Ser Asp Thr Gly Thr Thr Gly Lys Pro Leu Gly
 500 505 510
 Gly Ile Arg Glu Lys Asp Tyr Thr Leu Asn Thr Ser Leu Ala Thr Thr

 515 520 525
 Glu Tyr Leu Arg Ser Lys Gly Phe Asn Val Ile Met Thr Arg Asp Thr
 530 535 540
 Asp Lys Thr Leu Ser Leu Gly Asn Arg Thr Ala Leu Ser Asn Ser Leu
 545 550 555 560
 Arg Pro Asp Leu Phe Thr Ser Ile His Tyr Asn Ala Ser Asp Thr Thr
 565 570 575
 Gly Asn Gly Val Glu Val Phe Tyr Lys Leu Lys Asp Lys Asp Gly Gly

 580 585 590
 Thr Thr Lys Thr Val Ala Thr Asn Ile Leu Asn Arg Ile Leu Glu Lys
 595 600 605
 Phe Asn Leu Lys Asn Arg Gly Ala Lys Thr Arg Thr Leu Ser Thr Asp
 610 615 620
 Pro Thr Lys Asp Tyr Leu Tyr Val Leu Arg Asn Asn Asp Met Pro Ala
 625 630 635 640

Val Leu Val Glu Cys Ala Phe Leu Asp Asn Glu Lys Asp Met Ser Leu

645 650 655

Leu Asn Thr Ser Asn Lys Val Lys Glu Met Gly Thr Gln Ile Gly Lys

660 665 670

Gly Ile Glu Asp Ser Leu Lys

675

<210> 17

<211> 675

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 17

Met Met Lys Lys Thr Thr Lys Leu Leu Ala Thr Gly Met Leu Ser Val

1 5 10 15

Ala Met Val Ala Pro Asn Val Ala Leu Ala Ala Glu Asn Thr Thr Ala

20 25 30

Asn Thr Glu Ser Asn Ser Asp Ile Asn Ile Asn Leu Gln Arg Lys Ser

35 40 45

Val Val Leu Gly Ser Lys Ser Asn Ala Ser Val Lys Phe Lys Glu Lys

50 55 60

Leu Asn Ala Asp Ser Ile Thr Leu Asn Phe Met Cys Tyr Asp Met Pro

65 70 75 80

Leu Glu Ala Thr Leu Asn Tyr Asn Glu Lys Thr Asp Ser Tyr Glu Gly

85 90 95

Val Ile Asn Tyr Asn Lys Asp Pro Glu Tyr Leu Asn Val Trp Glu Leu

100 105 110

Gln Ser Ile Lys Ile Asn Gly Lys Asp Glu Gln Lys Val Leu Asn Lys

115 120 125

Glu Asp Leu Glu Ser Met Gly Leu Asn Leu Lys Asp Tyr Asp Val Thr

130 135 140

Gln Glu Phe Ile Ile Ser Asp Ala Asn Ser Thr Lys Ala Val Asn Glu

145 150 155 160

Tyr Met Arg Lys Thr Ser Ala Pro Val Lys Lys Leu Ala Gly Ala Thr
 165 170 175
 Arg Phe Glu Thr Ala Val Glu Ile Ser Lys Gln Gly Trp Lys Asp Gly
 180 185 190
 Ser Ser Lys Val Val Ile Val Asn Gly Glu Leu Ala Ala Asp Gly Ile
 195 200 205
 Thr Ala Thr Pro Leu Ala Ser Thr Tyr Asp Ala Pro Ile Leu Leu Ala
 210 215 220
 Asn Lys Asp Asp Ile Pro Glu Ser Thr Lys Ala Glu Leu Lys Arg Leu
 225 230 235 240
 Asn Pro Ser Asp Val Ile Ile Ile Gly Asp Asp Gly Ser Val Ser Gln
 245 250 255
 Lys Ala Val Ser Gln Ile Lys Ser Ala Val Asn Val Asn Val Thr Arg
 260 265 270
 Ile Gly Gly Val Asp Arg His Glu Thr Ser Leu Leu Ile Ala Lys Glu
 275 280 285
 Ile Asp Lys Tyr His Asp Val Asn Lys Ile Tyr Ile Ala Asn Gly Tyr
 290 295 300
 Ala Gly Glu Tyr Asp Ala Leu Asn Ile Ser Ser Lys Ala Gly Glu Asp
 305 310 315 320
 Gln Gln Pro Ile Ile Leu Ala Asn Lys Asp Ser Val Pro Gln Gly Thr
 325 330 335
 Tyr Asn Trp Leu Ser Ser Gln Gly Leu Glu Glu Ala Tyr Tyr Ile Gly
 340 345 350
 Gly Ser Gln Ser Leu Ser Ser Lys Ile Ile Asp Gln Ile Ser Lys Ile
 355 360 365
 Ala Lys Asn Gly Thr Ser Lys Asn Arg Val Ser Gly Ala Asp Arg His
 370 375 380
 Glu Thr Asn Ala Asn Val Ile Lys Thr Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Leu
 385 390 395 400
 Ser Ala Met Leu Val Ala Lys Ser Asp Ile Ile Val Asp Ser Ile Thr

405 410 415
 Ala Gly Pro Leu Ala Ala Lys Leu Lys Ala Pro Ile Leu Ile Thr Pro
 420 425 430
 Lys Thr Tyr Val Ser Ala Tyr His Ser Thr Asn Leu Ser Glu Lys Thr
 435 440 445
 Ala Glu Thr Val Tyr Gln Ile Gly Asp Gly Met Lys Asp Ser Val Ile
 450 455 460
 Asn Ser Ile Ala Ser Ser Leu Ser Lys His Asn Ala Pro Thr Glu Pro

 465 470 475 480
 Asp Asn Ser Gly Ser Ala Ala Gly Lys Thr Val Val Ile Asp Pro Gly
 485 490 495
 His Gly Gly Ser Asp Ser Gly Ala Thr Ser Gly Leu Asn Gly Gly Ala
 500 505 510
 Gln Glu Lys Lys Tyr Thr Leu Asn Thr Ala Leu Ala Thr Thr Glu Tyr
 515 520 525
 Leu Arg Ser Lys Gly Ile Asn Val Val Met Thr Arg Asp Thr Asp Lys

 530 535 540
 Thr Met Ala Leu Gly Glu Arg Thr Ala Leu Ser Asn Thr Ile Lys Pro
 545 550 555 560
 Asp Leu Phe Thr Ser Ile His Tyr Asn Ala Ser Asn Gly Ser Gly Asn
 565 570 575
 Gly Val Glu Ile Tyr Tyr Lys Val Lys Asp Lys Asn Gly Gly Thr Thr
 580 585 590
 Lys Thr Ala Ala Ser Asn Ile Leu Lys Arg Ile Leu Glu Lys Phe Asn

 595 600 605
 Met Lys Asn Arg Gly Ile Lys Thr Arg Thr Leu Asp Asn Gly Lys Asp
 610 615 620
 Tyr Leu Tyr Val Leu Arg Asn Asn Asn Tyr Pro Ala Ile Leu Val Glu
 625 630 635 640
 Cys Ala Phe Ile Asp Asn Lys Ser Asp Met Asp Lys Leu Asn Thr Ala
 645 650 655

Glu Lys Val Lys Thr Met Gly Thr Gln Ile Gly Ile Gly Ile Glu Asp

660 665 670

Thr Val Lys

675

<210> 18

<211> 618

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 18

Met Phe Arg Phe Lys Glu Lys Pro Asp Ala Asp Ser Ile Thr Leu Lys

1 5 10 15

Tyr Lys Cys Tyr Asp Met Pro Leu Asp Thr Thr Leu Asn Tyr Asn Gln

20 25 30

Ser Thr Glu Ser Tyr Glu Gly Thr Ile Asn Tyr Asn Lys Asp Pro Glu

35 40 45

Tyr Leu Asn Val Trp Glu Leu Gln Gly Ile Thr Ile Asn Ser Lys Asn

50 55 60

Asn Pro Lys Thr Leu Asn Lys Gln Glu Leu Glu Lys Met Gly Leu Asn

65 70 75 80

Leu Lys Asp Tyr Asn Val Thr Gln Glu Cys Ile Ile Glu Asp Ile Thr

85 90 95

Ser Arg Lys Asp Val Asn Lys Tyr Leu Arg Lys Thr Ser Ala Pro Ile

100 105 110

Thr Glu Leu Thr Gly Ser Asp Arg Tyr Glu Thr Ala Val Lys Ile Ser

115 120 125

Lys Glu Gly Trp Lys Asn Gly Ser Asp Lys Val Val Ile Ile Asn Gly

130 135 140

Asp Val Ser Ile Asp Gly Ile Ile Ser Thr Pro Leu Ala Thr Thr Tyr

145 150 155 160

Asn Ala Pro Ile Leu Leu Val Glu Lys Asn Asn Val Pro Asn Ser Val

165 170 175

Lys Ser Glu Leu Lys Arg Leu Asn Pro Arg Asp Val Ile Ile Ile Gly
 180 185 190
 Asp Glu Asn Ala Ile Ser Lys Thr Thr Ala Asn Gln Ile Lys Ser Thr
 195 200 205
 Val Asn Ala Ser Gln Thr Arg Leu Lys Gly Ser Asn Arg Tyr Glu Thr
 210 215 220
 Ser Leu Leu Ile Ala Lys Glu Ile Asp Lys Asn His Asp Val Glu Lys
 225 230 235 240

 Val Tyr Ile Thr Asn Ala Asn Gly Gly Glu Val Asp Ala Leu Thr Ile
 245 250 255
 Ala Ala Lys Ala Gly Gln Asp Lys Gln Pro Ile Ile Leu Thr Asp Lys
 260 265 270
 Asn Ser Ile Thr Asp Asn Thr Tyr Lys Trp Leu Lys Ser Glu Asp Leu
 275 280 285
 Gln Asn Ala Tyr Phe Ile Gly Gly Pro Gln Met Ile Ser Thr Asn Val
 290 295 300

 Ile Asn Lys Val Asn Asp Ile Thr Lys Asp Asn Val Thr Asn Asn Arg
 305 310 315 320
 Val Tyr Gly Ala Asp Arg His Glu Thr Asn Ala Asn Val Ile Lys Lys
 325 330 335
 Phe Tyr Thr Asp Asp Glu Leu Glu Ala Val Leu Val Ala Lys Ser Asp
 340 345 350
 Val Leu Val Asp Ala Leu Ala Ala Gly Pro Leu Ala Ala Asn Leu Lys
 355 360 365

 Ser Pro Ile Leu Ile Thr Pro Lys Thr Tyr Val Ser Ala Tyr His Lys
 370 375 380
 Asp Asn Leu Glu Ala Lys Ser Ala Asn Lys Val Tyr Lys Ile Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Leu Thr Ser Lys Val Met Asn Ser Ile Ala Ser Ser Leu Ser Lys
 405 410 415
 His Asn Thr Thr Pro Thr Glu Pro Gly Asn Ser Gly Gly Lys Thr Val

420 425 430
 Met Ile Asp Pro Gly His Gly Gly Ser Asp Thr Gly Thr Thr Gly Lys
 435 440 445
 Pro Leu Gly Gly Ile Lys Glu Lys Asp Tyr Thr Leu Asn Thr Ser Leu
 450 455 460
 Ala Thr Thr Glu Tyr Leu Arg Ser Lys Gly Phe Asn Val Ile Met Thr
 465 470 475 480
 Arg Asp Thr Asp Lys Thr Leu Ser Leu Gly Asn Arg Thr Ala Leu Ser
 485 490 495

 Asn Ser Leu Arg Pro Asp Leu Phe Thr Ser Ile His Tyr Asn Ala Ser
 500 505 510
 Asp Thr Thr Gly Asn Gly Val Glu Val Phe Tyr Lys Leu Lys Asp Lys
 515 520 525
 Asp Gly Gly Thr Thr Lys Thr Val Ala Thr Asn Ile Leu Asn Arg Ile
 530 535 540
 Leu Glu Lys Phe Asn Leu Lys Asn Arg Gly Ala Lys Thr Arg Thr Leu
 545 550 555 560

 Ser Thr Asp Pro Thr Lys Asp Tyr Leu Tyr Val Leu Arg Asn Asn Asp
 565 570 575
 Met Pro Ala Val Leu Val Glu Cys Ala Phe Leu Asp Asn Glu Lys Asp
 580 585 590
 Met Ser Leu Leu Asn Thr Ser Asn Lys Val Lys Glu Met Gly Thr Gln
 595 600 605
 Ile Gly Lys Gly Ile Glu Asp Ser Leu Lys
 610 615
 <210> 19
 <211> 552
 <212>
 > PRT
 <213> Clostridium difficile
 <400> 19
 Met Leu Ser Lys Glu Ile Asn Met Arg Arg Asn Thr Lys Leu Leu Thr

1 5 10 15
 Thr Gly Ile Leu Ser Met Ala Ile Val Ala Pro Thr Met Ala Phe Ala
 20 25 30
 Thr Glu Ser Asn Ala Met Glu Asn Asn Ala Asp Leu Asn Ile Asn Leu
 35 40 45
 Glu Lys Lys Ser Ile Val Leu Gly Ser Lys Ser Lys Val Ser Val Lys

 50 55 60
 Phe Lys Glu Lys Pro Asp Ala Asp Ser Ile Thr Leu Lys Tyr Lys Cys
 65 70 75 80
 Tyr Asp Met Pro Leu Asp Thr Thr Leu Asn Tyr Asn Gln Ser Thr Gly
 85 90 95
 Ala Tyr Glu Gly Thr Ile Asn Tyr Asn Gln Asp Pro Glu Tyr Leu Asn
 100 105 110
 Val Trp Glu Leu Gln Gly Ile Thr Ile Asn Ser Lys Asn Asn Pro Lys

 115 120 125
 Thr Leu Asn Gly Gln Asp Leu Glu Lys Met Gly Leu Asn Leu Lys Asp
 130 135 140
 Tyr Asn Val Thr Gln Glu Cys Ile Ile Glu Asp Ile Thr Ser Arg Lys
 145 150 155 160
 Asp Val Asn Lys Tyr Leu Arg Lys Thr Ser Ala Pro Ile Thr Glu Leu
 165 170 175
 Thr Gly Ser Asp Arg Tyr Glu Thr Ala Val Lys Ile Ser Lys Glu Gly

 180 185 190
 Trp Lys Asn Gly Ser Asp Lys Val Val Ile Ile Asn Gly Asp Val Ser
 195 200 205
 Ile Asp Gly Ile Ile Ser Thr Pro Leu Ala Thr Thr Tyr Asn Ala Pro
 210 215 220
 Ile Leu Leu Val Glu Lys Asn Asn Val Pro Asn Ser Val Lys Ser Glu
 225 230 235 240
 Leu Lys Arg Leu Asn Pro Lys Asp Ile Ile Ile Ile Gly Asp Glu Asn

 245 250 255

Ala Ile Ser Lys Thr Thr Ala Asn Gln Ile Lys Ser Thr Val Asn Ala
260 265 270

Ser Gln Thr Arg Leu Asn Gly Ser Asn Arg Tyr Glu Thr Ser Leu Leu
275 280 285

Ile Ala Lys Glu Ile Asp Lys Asn His Asp Val Glu Lys Val Tyr Ile
290 295 300

Thr Asn Ala Asn Gly Gly Glu Val Asp Ala Leu Thr Ile Ala Ala Lys

305 310 315 320

Ala Gly Gln Asp Lys Gln Pro Ile Ile Leu Thr Asp Lys Asp Ser Ile
325 330 335

Thr Asp Asn Thr Tyr Lys Trp Leu Lys Ser Glu Asp Leu Gln Asn Ala
340 345 350

Tyr Phe Ile Gly Gly Pro Gln Met Ile Ser Thr Asn Val Ile Asn Lys
355 360 365

Val Asn Gly Ile Thr Lys Asp Ser Val Thr Asn Asn Arg Val Tyr Gly

370 375 380

Ala Asp Arg His Glu Thr Asn Ala Asn Val Ile Lys Lys Phe Tyr Thr
385 390 395 400

Glu Asp Glu Ile Glu Ala Val Leu Val Ala Lys Ser Asp Val Leu Val
405 410 415

Asp Ala Leu Ala Ala Gly Pro Leu Ala Ala Asn Leu Lys Ser Pro Ile
420 425 430

Leu Ile Thr Pro Lys Thr Tyr Val Ser Ala Tyr His Lys Asp Asn Leu

435 440 445

Glu Ala Lys Ser Ala Asn Lys Val Tyr Lys Ile Gly Gly Gly Leu Thr
450 455 460

Ser Lys Val Met Ser Ser Ile Ala Ser Ser Leu Ser Lys His Asn Thr
465 470 475 480

Thr Pro Thr Glu Pro Gly Asn Ser Gly Gly Lys Thr Val Met Ile Asp
485 490 495

Pro Gly His Gly Gly Ser Ala Pro Gly Asn Ser Ser Gly Gly Met Ile

500 505 510
 Glu Lys Asp Tyr Asn Leu Asn Thr Ser Leu Ala Thr Thr Glu Tyr Leu
 515 520 525
 Arg Ser Lys Gly Phe Asn Val Ile Met Thr Arg Asp Thr Asp Lys Thr
 530 535 540
 Leu Ser Leu Gly Asn Arg Thr Ala
 545 550
 <210> 20
 <211> 675
 <212> PRT
 <213> Clostridium difficile
 <400> 20
 Met Met Lys Lys Thr Thr Lys Leu Leu Ala Thr Gly Met Leu Ser Val

 1 5 10 15
 Ala Met Val Ala Pro Asn Val Ala Leu Ala Ala Glu Asn Thr Thr Ala
 20 25 30
 Asn Thr Glu Ser Asn Ser Asp Ile Asn Ile Asn Leu Gln Arg Lys Ser
 35 40 45
 Val Val Leu Gly Ser Lys Ser Asn Ala Ser Val Lys Phe Lys Glu Lys
 50 55 60
 Leu Asn Ala Asp Ser Ile Thr Leu Asn Phe Met Cys Tyr Asp Met Pro

 65 70 75 80
 Leu Glu Ala Thr Leu Asn Tyr Asn Glu Lys Thr Asp Ser Tyr Glu Gly
 85 90 95
 Val Ile Asn Tyr Asn Lys Asp Pro Glu Tyr Leu Asn Val Trp Glu Leu
 100 105 110
 Gln Ser Ile Lys Ile Asn Gly Lys Asp Glu Gln Lys Val Leu Asn Lys
 115 120 125
 Glu Asp Leu Glu Ser Met Gly Leu Asn Leu Lys Asp Tyr Asp Val Thr

 130 135 140
 Gln Glu Phe Ile Ile Ser Asp Ala Asn Ser Thr Lys Ala Val Asn Glu
 145 150 155 160

Tyr Met Arg Lys Thr Ser Ala Pro Val Lys Lys Leu Ala Gly Ala Thr
 165 170 175
 Arg Phe Glu Thr Ala Val Glu Ile Ser Lys Gln Gly Trp Lys Asp Gly
 180 185 190
 Ser Ser Lys Val Val Ile Val Asn Gly Glu Leu Ala Ala Asp Gly Ile
 195 200 205
 Thr Ala Thr Pro Leu Ala Ser Thr Tyr Asp Ala Pro Ile Leu Leu Ala
 210 215 220
 Asn Lys Asp Asp Ile Pro Glu Ser Thr Lys Ala Glu Leu Lys Arg Leu
 225 230 235 240
 Asn Pro Ser Asp Val Ile Ile Ile Gly Asp Asp Gly Ser Val Ser Gln
 245 250 255
 Lys Ala Val Ser Gln Ile Lys Ser Ala Val Asn Val Asn Val Thr Arg
 260 265 270
 Ile Gly Gly Val Asp Arg His Glu Thr Ser Leu Leu Ile Ala Lys Glu
 275 280 285
 Ile Asp Lys Tyr His Asp Val Asn Lys Ile Tyr Ile Ala Asn Gly Tyr
 290 295 300
 Ala Gly Glu Tyr Asp Ala Leu Asn Ile Ser Ser Lys Ala Gly Glu Asp
 305 310 315 320
 Gln Gln Pro Ile Ile Leu Ala Asn Lys Asp Ser Val Pro Gln Gly Thr
 325 330 335
 Tyr Asn Trp Leu Ser Ser Gln Gly Leu Glu Glu Ala Tyr Tyr Ile Gly
 340 345 350
 Gly Ser Gln Ser Leu Ser Ser Lys Ile Ile Asp Gln Ile Ser Lys Ile
 355 360 365
 Ala Lys Asn Gly Thr Ser Lys Asn Arg Val Ser Gly Ala Asp Arg His
 370 375 380
 Glu Thr Asn Ala Asn Val Ile Lys Thr Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Leu
 385 390 395 400
 Ser Ala Met Leu Val Ala Lys Ser Asp Ile Ile Val Asp Ser Ile Thr

405 410 415
 Ala Gly Pro Leu Ala Ala Lys Leu Lys Ala Pro Ile Leu Ile Thr Pro
 420 425 430
 Lys Thr Tyr Val Ser Ala Tyr His Ser Thr Asn Leu Ser Glu Lys Thr
 435 440 445
 Ala Gly Thr Val Tyr Gln Ile Gly Asp Gly Met Lys Asp Ser Val Ile

 450 455 460
 Asn Ser Ile Ala Ser Ser Leu Ser Lys His Asn Ala Pro Thr Glu Pro
 465 470 475 480
 Asp Asn Ser Gly Ser Ala Ala Gly Lys Thr Val Val Ile Asp Pro Gly
 485 490 495
 His Gly Gly Ser Asp Ser Gly Ala Thr Ser Gly Leu Asn Gly Gly Ala
 500 505 510
 Gln Glu Lys Lys Tyr Thr Leu Asn Thr Ala Leu Ala Thr Thr Glu Tyr

 515 520 525
 Leu Arg Ser Lys Gly Ile Asn Val Val Met Thr Arg Asp Thr Asp Lys
 530 535 540
 Thr Met Ala Leu Gly Glu Arg Thr Ala Leu Ser Asn Thr Ile Lys Pro
 545 550 555 560
 Asp Leu Phe Thr Ser Ile His Tyr Asn Ala Ser Asn Gly Ala Gly Asn
 565 570 575
 Gly Val Glu Ile Tyr Tyr Lys Val Lys Asp Lys Asn Gly Gly Thr Thr

 580 585 590
 Lys Thr Ala Ala Ser Asn Ile Leu Lys Arg Ile Leu Glu Lys Phe Asn
 595 600 605
 Met Lys Asn Arg Gly Ile Lys Thr Arg Thr Leu Asp Asn Gly Lys Asp
 610 615 620
 Tyr Leu Tyr Val Leu Arg Asn Asn Asn Tyr Pro Ala Ile Leu Val Glu
 625 630 635 640
 Cys Ala Phe Ile Asp Asn Lys Ser Asp Met Asp Lys Leu Asn Thr Ala

 645 650 655

Glu Lys Val Lys Thr Met Gly Thr Gln Ile Gly Ile Gly Ile Glu Asp
660 665 670

Thr Val Lys
675

<210> 21

<211> 333

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 21

Lys Ile Lys Lys Phe Thr Leu Leu Ile Ser Ile Met Ile Ile Phe Leu
1 5 10 15

Cys Ala Val Val Gly Val Tyr Ser Thr Ser Ser Asn Lys Ser Val Asp
20 25 30

Leu Tyr Ser Asp Val Tyr Ile Glu Lys Tyr Phe Asn Arg Asp Lys Val
35 40 45

Met Glu Val Asn Ile Glu Ile Asp Glu Ser Asp Leu Lys Asp Met Asn
50 55 60

Glu Asn Ala Ile Lys Glu Glu Phe Lys Val Ala Lys Val Thr Val Asp
65 70 75 80

Gly Asp Thr Tyr Gly Asn Val Gly Ile Arg Thr Lys Gly Asn Ser Ser
85 90 95

Leu Thr Ser Val Ala Asn Ser Asp Ser Asp Arg Tyr Ser Tyr Lys Ile
100 105 110

Asn Phe Asp Lys Tyr Asn Thr Ser Gln Ser Met Glu Gly Leu Thr Gln
115 120 125

Leu Asn Leu Asn Asn Cys Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Met Arg Glu Phe
130 135 140

Leu Thr Tyr Ser Ile Cys Glu Glu Met Gly Leu Ala Thr Pro Glu Phe
145 150 155 160

Ala Tyr Ala Lys Val Ser Ile Asn Gly Glu Tyr His Gly Leu Tyr Leu
165 170 175

Ala Val Glu Gly Leu Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Asn Asn Phe Gly Asn

180 185 190
 Val Thr Gly Asp Leu Tyr Lys Ser Asp Glu Gly Ser Ser Leu Gln Tyr
 195 200 205
 Lys Gly Asp Asp Pro Glu Ser Tyr Ser Asn Leu Ile Val Glu Ser Asp
 210 215 220

 Lys Lys Thr Ala Asp Trp Ser Lys Ile Thr Lys Leu Leu Lys Ser Leu
 225 230 235 240
 Asp Thr Gly Glu Asp Ile Glu Lys Tyr Leu Asp Val Asp Ser Val Leu
 245 250 255
 Lys Asn Ile Ala Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Leu Asp Ser Tyr Gln
 260 265 270
 Gly Ser Phe Ala His Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Gln Asp Gly Val Phe
 275 280 285

 Ser Met Leu Pro Trp Asp Phe Asn Met Ser Phe Gly Gly Phe Ser Gly
 290 295 300
 Phe Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ile Ala Ile Asp Glu Pro Thr Thr Gly
 305 310 315 320
 Asn Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ile Ser Ser Leu Leu Lys
 325 330

 <210> 22
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> Clostridium difficile
 <400> 22

 Lys Asn Glu Thr His Lys Thr Lys Tyr His Lys Tyr Leu Glu Glu Ile

 1 5 10 15
 Val Thr Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Tyr Leu Glu Asn Met Thr Thr Lys
 20 25 30
 Leu His Asp Met Ile Ala Ser Tyr Val Lys Glu Asp Pro Thr Ala Phe
 35 40 45
 Tyr Thr Tyr Glu Glu Phe Glu Lys Asn Ile Thr Ser Ser Ile Glu Asp
 50 55 60

Ser Ser Asp Asn Lys Gly Phe Gly Asn Lys Gly Phe Asp Asn Asn Asn

65 70 75 80

Ser Asn Asn Ser Asp Ser Asn Asn Asn Ser Asn Ser Glu Asn Lys Arg

85 90 95

Ser Gly Asn Gln Ser Asp Lys Lys Glu Val Asn Ala Glu Leu Thr Ser

100 105 110

Ser Val Val Lys Thr Asn Thr Asp Asn Glu Thr Glu Asn Lys Thr Thr

115 120 125

Asn Asp Ser Glu Ser Lys Asn Asn Thr Asp Lys Asp Lys Ser Gly Asn

130 135 140

Asp Asn Asn Gln Lys Leu Glu Gly Pro Arg Gly Lys Gly Gly Lys Ser

145 150 155 160

Ile Pro Gly Val Leu Glu Val Ala Glu Asp Met Ser Lys Thr Ile Lys

165 170 175

Ser Gln Leu Ser Gly Glu Thr Ser Ser Thr Lys Gln Asn Ser Gly Asp

180 185 190

Glu Ser Ser Ser Gly Ile Lys Gly Ser Glu Lys Phe Asp Glu Asp Met

195 200 205

Ser Gly Met Pro Glu Pro Pro Glu Gly Met Asp Gly Lys Met Pro Pro

210 215 220

Gly Met Gly Asn Met Asp Lys Gly Asp Met Asn Gly Lys Asn Gly Asn

225 230 235 240

Met Asn Met Asp Arg Asn Gln Asp Asn Pro Arg Glu Ala Gly Gly Phe

245 250 255

Gly Asn Arg Gly Gly Gly Ser Val Ser Lys Thr Thr Thr Tyr Phe Lys

260 265 270

Leu Ile Leu Gly Gly Ala Ser Met Ile Ile Met Ser Ile Met Leu Val

275 280 285

Gly Val Ser Arg Val Lys Arg Arg Arg Phe Ile Lys Ser Lys

290 295 300

<210> 23

<211> 635

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 23

Met Lys Asp Lys Lys Phe Thr Leu Leu Ile Ser Ile Met Ile Ile Phe

1 5 10 15

Leu Cys Ala Val Val Gly Val Tyr Ser Thr Ser Ser Asn Lys Ser Val

20 25 30

Asp Leu Tyr Ser Asp Val Tyr Ile Glu Lys Tyr Phe Asn Arg Asp Lys

35 40 45

Val Met Glu Val Asn Ile Glu Ile Asp Glu Ser Asp Leu Lys Asp Met

50 55 60

Asn Glu Asn Ala Ile Lys Glu Glu Phe Lys Val Ala Lys Val Thr Val

65 70 75 80

Asp Gly Asp Thr Tyr Gly Asn Val Gly Ile Arg Thr Lys Gly Asn Ser

85 90 95

Ser Leu Thr Ser Val Ala Asn Ser Asp Ser Asp Arg Tyr Ser Tyr Lys

100 105 110

Ile Asn Phe Asp Lys Tyr Asn Thr Ser Gln Ser Met Glu Gly Leu Thr

115 120 125

Gln Leu Asn Leu Asn Asn Cys Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Met Arg Glu

130 135 140

Phe Leu Thr Tyr Ser Ile Cys Glu Glu Met Gly Leu Ala Thr Pro Glu

145 150 155 160

Phe Ala Tyr Ala Lys Val Ser Ile Asn Gly Glu Tyr His Gly Leu Tyr

165 170 175

Leu Ala Val Glu Gly Leu Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Asn Asn Phe Gly

180 185 190

Asn Val Thr Gly Asp Leu Tyr Lys Ser Asp Glu Gly Ser Ser Leu Gln

195 200 205

Tyr Lys Gly Asp Asp Pro Glu Ser Tyr Ser Asn Leu Ile Val Glu Ser

210 215 220
 Asp Lys Lys Thr Ala Asp Trp Ser Lys Ile Thr Lys Leu Leu Lys Ser
 225 230 235 240
 Leu Asp Thr Gly Glu Asp Ile Glu Lys Tyr Leu Asp Val Asp Ser Val
 245 250 255
 Leu Lys Asn Ile Ala Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Leu Asp Ser Tyr
 260 265 270

 Gln Gly Ser Phe Ala His Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Gln Asp Gly Val
 275 280 285
 Phe Ser Met Leu Pro Trp Asp Phe Asn Met Ser Phe Gly Gly Phe Ser
 290 295 300
 Gly Phe Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ile Ala Ile Asp Glu Pro Thr Thr
 305 310 315 320
 Gly Asn Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ile Ser Ser Leu Leu Lys Asn Glu
 325 330 335

 Thr His Lys Thr Lys Tyr His Lys Tyr Leu Glu Glu Ile Val Thr Lys
 340 345 350
 Tyr Leu Asp Ser Asp Tyr Leu Glu Asn Met Thr Thr Lys Leu His Asp
 355 360 365
 Met Ile Ala Ser Tyr Val Lys Glu Asp Pro Thr Ala Phe Tyr Thr Tyr
 370 375 380
 Glu Glu Phe Glu Lys Asn Ile Thr Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Asp
 385 390 395 400

 Asn Lys Gly Phe Gly Asn Lys Gly Phe Asp Asn Asn Asn Ser Asn Asn
 405 410 415
 Ser Asp Ser Asn Asn Asn Ser Asn Ser Glu Asn Lys Arg Ser Gly Asn
 420 425 430
 Gln Ser Asp Lys Lys Glu Val Asn Ala Glu Leu Thr Ser Ser Val Val
 435 440 445
 Lys Thr Asn Thr Asp Asn Glu Thr Glu Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ser
 450 455 460

Glu Ser Lys Asn Asn Thr Asp Lys Asp Lys Ser Gly Asn Asp Asn Asn
 465 470 475 480
 Gln Lys Leu Glu Gly Pro Arg Gly Lys Gly Gly Lys Ser Ile Pro Gly
 485 490 495
 Val Leu Glu Val Ala Glu Asp Met Ser Lys Thr Ile Lys Ser Gln Leu
 500 505 510
 Ser Gly Glu Thr Ser Ser Thr Lys Gln Asn Ser Gly Asp Glu Ser Ser
 515 520 525

Ser Gly Ile Lys Gly Ser Glu Lys Phe Asp Glu Asp Met Ser Gly Met
 530 535 540
 Pro Glu Pro Pro Glu Gly Met Asp Gly Lys Met Pro Pro Gly Met Gly
 545 550 555 560
 Asn Met Asp Lys Gly Asp Met Asn Gly Lys Asn Gly Asn Met Asn Met
 565 570 575
 Asp Arg Asn Gln Asp Asn Pro Arg Glu Ala Gly Gly Phe Gly Asn Arg
 580 585 590

Gly Gly Gly Ser Val Ser Lys Thr Thr Thr Tyr Phe Lys Leu Ile Leu
 595 600 605
 Gly Gly Ala Ser Met Ile Ile Met Ser Ile Met Leu Val Gly Val Ser
 610 615 620
 Arg Val Lys Arg Arg Arg Phe Ile Lys Ser Lys
 625 630 635

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD1021 primer + restriction site

<400> 24

taagctagca tgaaagataa aaaatttacc

30

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD1021 primer + restriction site

<400> 25

ttactcgagt ttgacttta taaatcttct 30

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD1021 primer + restriction site

<400> 26

acagctagca tgaaaagtgt tgatttatat agt 33

<210> 27

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD1021 primer + restriction site

<400> 27

atcttcgaga gtattatact tatcaaaatt a 31

<210> 28

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD1021 primer + restriction site

<400> 28

aatgctagca tggtaactgg agacttatat aagtca 36

<210> 29

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD1021 primer + restriction site

<400> 29

aaactcgagt ggtaacatag aaaatactcc at 32

<210> 30

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD1021 primer + restriction site

<400> 30

gcagctagca tgagtaaac tataaatct caa 33

<210> 31

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD1021 primer + restriction site

<400> 31

aatctcgagg aagtatgttg ttgttttact cac 33

<210> 32

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD1021 primer + restriction site

<400> 32

gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 33

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD1021 primer + restriction site

<400> 33

caggaaacag ctatgac 17

<210> 34

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD1036 + restriction site

<400> 34

aatccatggt aagtaaggag attaatatg 29

<210> 35

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD1036 primer + restriction site

<400>

> 35

ttcctcgagt tttaatgaat cttctattcc 30

<210> 36

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD1036 primer + restriction site

<400> 36

aggccatgga taaaaatcat gatgtggaa 29

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD1036 primer + restriction site

<400> 37

tttctcgagg ttgcatttg tttcgtgtct 30

<210> 38

<211> 635

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Consensus protein sequence for CD1021

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(12)

<223> An "X" designates a residue where variants were observed among the sequences (SEQ ID NOS: 1, 11, 12, 21, 22, 23) aligned in Figure 1. Variations included amino acid substitutions and/or gaps between two or more sequences at the respective residues.

<220><221> VARIANT

<222> (15)..(15)

<223> An "X" designates a residue where variants were observed among

the sequences (SEQ ID NOS: 1, 11, 12, 21, 22, 23) aligned in Figure 1. Variations included amino acid substitutions and/or gaps between two or more sequences at residue 15.

<220><221> VARIANT

<222> (99)..(99)

<223> An "X" designates a residue where variants were observed among the sequences (SEQ ID NOS: 1, 11, 12, 21, 22, 23) aligned in Figure 1. Variations included amino acid substitutions and/or gaps between two or more sequences at residue 99.

<220><221> VARIANT

<222> (334)..(361)

<223> An "X" designates a residue where variants were observed among the sequences (SEQ ID NOS: 1, 11, 12, 21, 22, 23) aligned in Figure 1. Variations included amino acid substitutions and/or gaps between two or more sequences at the respective residues.

<400> 38

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Met Ile Xaa Phe

1 5 10 15

Leu Cys Ala Val Val Gly Val Tyr Ser Thr Ser Ser Asn Lys Ser Val

20 25 30

Asp Leu Tyr Ser Asp Val Tyr Ile Glu Lys Tyr Phe Asn Arg Asp Lys

35 40 45

Val Met Glu Val Asn Ile Glu Ile Asp Glu Ser Asp Leu Lys Asp Met

50 55 60

Asn Glu Asn Ala Ile Lys Glu Glu Phe Lys Val Ala Lys Val Thr Val

65 70 75 80

Asp Gly Asp Thr Tyr Gly Asn Val Gly Ile Arg Thr Lys Gly Asn Ser

85 90 95

Ser Leu Xaa Ser Val Ala Asn Ser Asp Ser Asp Arg Tyr Ser Tyr Lys
100 105 110
Ile Asn Phe Asp Lys Tyr Asn Thr Ser Gln Ser Met Glu Gly Leu Thr
115 120 125
Gln Leu Asn Leu Asn Asn Cys Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Met Arg Glu
130 135 140
Phe Leu Thr Tyr Ser Ile Cys Glu Glu Met Gly Leu Ala Thr Pro Glu
145 150 155 160
Phe Ala Tyr Ala Lys Val Ser Ile Asn Gly Glu Tyr His Gly Leu Tyr
165 170 175
Leu Ala Val Glu Gly Leu Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Asn Asn Phe Gly
180 185 190
Asn Val Thr Gly Asp Leu Tyr Lys Ser Asp Glu Gly Ser Ser Leu Gln
195 200 205
Tyr Lys Gly Asp Asp Pro Glu Ser Tyr Ser Asn Leu Ile Val Glu Ser
210 215 220
Asp Lys Lys Thr Ala Asp Trp Ser Lys Ile Thr Lys Leu Leu Lys Ser
225 230 235 240
Leu Asp Thr Gly Glu Asp Ile Glu Lys Tyr Leu Asp Val Asp Ser Val
245 250 255
Leu Lys Asn Ile Ala Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Leu Asp Ser Tyr
260 265 270
Gln Gly Ser Phe Ala His Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Gln Asp Gly Val
275 280 285
Phe Ser Met Leu Pro Trp Asp Phe Asn Met Ser Phe Gly Gly Phe Ser
290 295 300
Gly Phe Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ile Ala Ile Asp Glu Pro Thr Thr
305 310 315 320
Gly Asn Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ile Ser Ser Leu Leu Lys Xaa Xaa
325 330 335
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

340 345 350
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Met Thr Thr Lys Leu His Asp
 355 360 365
 Met Ile Ala Ser Tyr Val Lys Glu Asp Pro Thr Ala Phe Tyr Thr Tyr
 370 375 380
 Glu Glu Phe Glu Lys Asn Ile Thr Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Asp
 385 390 395 400
 Asn Lys Gly Phe Gly Asn Lys Gly Phe Asp Asn Asn Asn Ser Asn Asn

 405 410 415
 Ser Asp Ser Asn Asn Asn Ser Asn Ser Glu Asn Lys Arg Ser Gly Asn
 420 425 430
 Gln Ser Asp Lys Lys Glu Val Asn Ala Glu Leu Thr Ser Ser Val Val
 435 440 445
 Lys Thr Asn Thr Asp Asn Glu Thr Glu Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ser
 450 455 460
 Glu Ser Lys Asn Asn Thr Asp Lys Asp Lys Ser Gly Asn Asp Asn Asn

 465 470 475 480
 Gln Lys Leu Glu Gly Pro Arg Gly Lys Gly Gly Lys Ser Ile Pro Gly
 485 490 495
 Val Leu Glu Val Ala Glu Asp Met Ser Lys Thr Ile Lys Ser Gln Leu
 500 505 510
 Ser Gly Glu Thr Ser Ser Thr Lys Gln Asn Ser Gly Asp Glu Ser Ser
 515 520 525
 Ser Gly Ile Lys Gly Ser Glu Lys Phe Asp Glu Asp Met Ser Gly Met

 530 535 540
 Pro Glu Pro Pro Glu Gly Met Asp Gly Lys Met Pro Pro Gly Met Gly
 545 550 555 560
 Asn Met Asp Lys Gly Asp Met Asn Gly Lys Asn Gly Asn Met Asn Met
 565 570 575
 Asp Arg Asn Gln Asp Asn Pro Arg Glu Ala Gly Gly Phe Gly Asn Arg
 580 585 590

Gly Gly Gly Ser Val Ser Lys Thr Thr Thr Tyr Phe Lys Leu Ile Leu

595 600 605
Gly Gly Ala Ser Met Ile Ile Met Ser Ile Met Leu Val Gly Val Ser

610 615 620
Arg Val Lys Arg Arg Arg Phe Ile Lys Ser Lys

625 630 635

<210> 39

<211> 1905

<212> DNA

<213> Clostridium difficile

<400> 39

atgaaagata aaaaatttac ctttcttatac tcgattatga ttatatTTTT atgtgctgta 60
gttggagttt atagtacatc tagcaacaaa agtgttgatt tatatagtga tgtatatatt 120

gaaaaatatt ttaacagaga caaggttatg gaagttaata tagagataga tgaaagtgc 180
ttgaaggata tgaatgaaaa tgctataaaa gaagaattta aggttgcaaa agtaactgta 240
gatggagata catatggaaa cgtaggtata agaactaaag gaaattcaag tcttatatct 300
gtagcaaata gtgatagtga tagatacagc tataagatta attttgataa gtataaact 360
agtcaaagta tggaagggt tactcaatta aatcttaata actgttactc tgacctatct 420
tatatgagag agtttttaac atatagtatt tgcgaggaaa tgggattagc gactccagaa 480
tttgcataatg ctaaagtctc tataaatggc gaatatcatg gtttgtattt ggcagtagaa 540

ggattaaaag agtcttatct tgaaaaataat tttggtaatg taactggaga cttatataag 600
tcagatgaag gaagctcgtt gcaatataaa ggagatgacc cagaaagta ctcaactta 660
atcgttgaaa gtgataaaaa gacagctgat tggctctaaa tcacaaaact attaaaatct 720
ttggatacag gtgaagatat tgaaaaatat ctgatgtag attctgtcct taaaaatata 780
gcaataaata cagctttatt aaaccttgat agctatcaag ggagttttgc ccataactat 840
tatttatatg agcaagatgg agtatcttct atgttaccat gggattttta tatgtcattt 900
ggtggattta gtggttttgg tggaggtagt caatctatag caattgatga acctacgaca 960

ggtaatttag aagacagacc tctcatatcc tcgttattaa aaaatgagac atacaaaaca 1020
aaataccata aatatctgga agagatagta acaaaatacc tagattcaga ctatttagag 1080
aatatgacaa caaaattgca tgacatgata gcatcatatg taaaagaaga cccaacagca 1140
ttttatactt atgaagaatt tgaaaaaat ataacatctt caattgaaga ttctagtatg 1200

aataagggat ttgtaataa agggtttgac aacaataact ctaataacag tgattcta	1260
aataattcta atagtgtaaa taagcgctct ggaaatcaaa gtgatgtaaa agaagtta	1320
gctgaattaa catcaagcgt agtcaaagct aatacagata atgaaactaa aaataaaact	1380
acaaatgata gtgaaagtaa gaataataca gataaagata aaagtggaaa tgataata	1440
caaaagctag aaggctctat gggtaaagga ggtaagtcaa taccaggggt tttggaagt	1500
gcagaagata tgagtaaaac tataaaatct caattaagtg gagaaacttc ttcgacaaag	1560
caaaactctg gtgatgtaaa ttcaagtga attaaaggta gtgaaaagtt tgatgaggat	1620
atgagtggta tgccagaacc acctgaggga atggatggta aatgccacc aggaatgggt	1680
aatatggata agggagatat gaatggtaaa aatggcaata tgaatatgga tagaaatcaa	1740
gataatccaa gagaagctgg aggttttggc aatagaggag gaggtctgtg gtagtaaaaca	1800
acaacatact tcaaattaat tttaggtgga gcttcaatga taataatgtc gattatgtta	1860
gttggtgtat caagggtaaa gagaagaaga ttataaagt caaaa	1905
<210> 40	
<211> 276	
<212> DNA	
<213> Clostridium difficile	
<400> 40	
atgaaaagtg ttgatttata tagtgatgta tatattgaaa aatattttta cagagacaag	60
gttatggaag ttaatataga gatagatgaa agtgacttga aggatatgaa tgaaaatgct	120
ataaaagaag aatttaaggt tgcaaaagta actgtagatg gagatacata tggaaacgta	180
ggtataagaa ctaaaggaaa ttcaagtcct atactgttag caaatagtga tagtgataga	240
tacagctata agattaattt tgataagtat aatact	276
<210> 41	
<211> 303	
<212> DNA	
<213> Clostridium difficile	
<400> 41	
atggtaactg gagacttata taagtcagat gaaggaagct cgttgcaata taaaggagat	60
gaccagaaa gttactcaaa cttaatcggt gaaagtgata aaaagacagc tgattggtct	120
aaaatcacia aactattaaa atctttggat acaggtgaag atattgaaaa atactttgat	180
gtagattctg tccttaaaaa tatagcaata aatacagctt tattaaacct tgatagctat	240

caaggagatt ttgcccataa ctattattta tatgagcaag atggagtatt ttctatgtta	300
cca	303
<210> 42	
<211> 303	
<212> DNA	
<213> Clostridium difficile	
<400> 42	
atgagtaaaa ctataaaatc tcaattaagt ggagaaactt cttcgacaaa gcaaaactct	60
ggtgatgaaa gttcaagtgg aattaaaggt agtgaaaagt ttgatgagga tatgagtgg	120
atgccagaac cacctgaggg aatggatggg aaaatgccac caggaatggg taatatggat	180
aaggagata tgaatggtaa aaatggcaat atgaatatgg atagaaatca agataatcca	240
agagaagctg gaggttttgg caatagagga ggaggctctg tgagtaaaac aacaacatac	300
ttc	303
<210> 43	
<211> 2031	
<212> DNA	
<213> Clostridium difficile	
<400> 43	
atggtaagta aggagattaa tatgagaaga aatacaaaat tattaacaac agggattctt	60
tcaatggcaa tcgtcgacc tacaatggca ttgtctactg aatctaagc tatggaaaat	120
aacgctgatt taaatataaa cttagagaaa aaaagtatcg ttttaggtag caaatcaaaa	180
gttagtgtca aatttaaaga aaaaccagat gcagatagca ttacattaaa gtataaatgc	240
tatgacatgc cattgaatac aactctaat tacaatcaat caactggggc atatgaagga	300
actatcaatt ataaccaaga cccagaatat ctaaatgttt gggaactaca agggataaca	360
ataaacagca aaaataatca taaaacttta aacagacaag acctagaaaa gctgggatta	420
aatttaaag actataatgt aacacaggaa tgtataattg aagatataac ttctagaaaa	480
gatgtaaata aatatttgag aaaaacttct tcacctatta cagaacttac aggaagtgat	540
agatatgaaa cagcagttaa aataagtaaa gagggctgga aaaatggttc agataaggta	600
gttataataa atggggatgt aagtatagat ggcatatat caactccact ggcaaccaca	660
tataatgcac caatactttt ggttgaaaaa aacaatgtac ctaatagtgt aaaatcagaa	720
ttaaagcgcc taaaccctaa agatataatt ataattggag atgagaatgc tatttctaaa	780

actactgcta atcaaattaa atcaactgta aatgctagtc aaacacgttt aaatggttct	840
aatagatatg agacatcttt attgatagca aaggaaatag ataaaaatca tgatgtggaa	900
aaagtataca taacaaatgc taatggcgga gaagtggatg cacttactat agcagcaaaa	960
gcaggtaag acaagcaacc aattatatta actgataaag atagtattac agacaataca	1020
tataaatggt taaagagtga ggatttaca aatgcttatt ttataggtgg tcctcaaatg	1080
atatcaacaa atgttataaa taaggtaa at ggaataacta aagatagtgt tactaataat	1140
agagtatacg gagcagatag acacgaaaca aatgcaaag taataaaaaa attctataca	1200
gatgatgagt tagaggctgt tttagtagct aaatcagatg tacttgttga tgcttttagca	1260
gcagggtccat tggctgcgaa cttaaaatct ccaatactta taacacaaaa gacgtatgta	1320
tctgcatacc ataaagataa tttagaagct aaatcagcta ataaggata caaaatagga	1380
ggaggattga ctctaaggt aatgagctct atagcatcat cattatctaa acacaatacg	1440
actccaacag aaccaggaag tagtgggggc aagacagtta tgattgaccc agggcatggt	1500
ggttcagcac ctggaaatc atctggagga atgattgaaa aagattacaa tttaataact	1560
tcacttgcaa caactgaata tttacgttca aagggttca atgtaataat gacaagagac	1620
acagataaga ctttatctct tggaaataga actgctctat ctaattcatt gaaaccagat	1680
ttatttaca gtatacatta taatggctca actaataaac aaggatcatgg tgtagaagta	1740
ttttataagc ttaaagataa aaatggaggg actactaaaa ctgtagctac caatatatta	1800
aatagaattt tagagaaatt taaacttaca aatagaggta taaaaacaag agtacttcct	1860
agtgattcta caaaagatta tttatacgtt ttaagaagta atgatatgcc agctgtactt	1920
gtagaatgtg catttttga taatgaaaat gatatgagtt taataaactc atctgcaaaa	1980
gtaaaagaaa tgggtacaca aataggtaaa ggaatagaag attcattaaa a	2031
<210> 44	
<211> 303	
<212> DNA	
<213> Clostridium difficile	
<400> 44	
atggataaaa atcatgatgt ggaaaaagta tacataacaa atgctaattg cggagaagtg	60
gatgcactta ctatagcagc aaaagcaggt caagacaagc aaccaattat attactgat	120
aaagatagta ttacagacaa tacatataaa tggttaaaga gtgaggattt acaaaatgct	180
tattttatag gtggtcctca aatgatatca acaaatgtta taaataaggt aaatggaata	240
actaaagata gtgttactaa taatagagta tacggagcag atagacacga aacaaatgca	300

aac

303

<210> 45

<211> 635

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 45

Met Lys Asp Lys Lys Phe Thr Leu Leu Ile Ser Ile Met Ile Ile Phe

1 5 10 15

Leu Cys Ala Val Val Gly Val Tyr Ser Thr Ser Ser Asn Lys Ser Val

20 25 30

Asp Leu Tyr Ser Asp Val Tyr Ile Glu Lys Tyr Phe Asn Arg Asp Lys

35 40 45

Val Met Glu Val Asn Ile Glu Ile Asp Glu Ser Asp Leu Lys Asp Met

50 55 60

Asn Glu Asn Ala Ile Lys Glu Glu Phe Lys Val Ala Lys Val Thr Val

65 70 75 80

Asp Gly Asp Thr Tyr Gly Asn Val Gly Ile Arg Thr Lys Gly Asn Ser

85 90 95

Ser Leu Ile Ser Val Ala Asn Ser Asp Ser Asp Arg Tyr Ser Tyr Lys

100 105 110

Ile Asn Phe Asp Lys Tyr Asn Thr Ser Gln Ser Met Glu Gly Leu Thr

115 120 125

Gln Leu Asn Leu Asn Asn Cys Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Met Arg Glu

130 135 140

Phe Leu Thr Tyr Ser Ile Cys Glu Glu Met Gly Leu Ala Thr Pro Glu

145 150 155 160

Phe Ala Tyr Ala Lys Val Ser Ile Asn Gly Glu Tyr His Gly Leu Tyr

165 170 175

Leu Ala Val Glu Gly Leu Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Asn Asn Phe Gly

180 185 190

Asn Val Thr Gly Asp Leu Tyr Lys Ser Asp Glu Gly Ser Ser Leu Gln

195 200 205

Tyr Lys Gly Asp Asp Pro Glu Ser Tyr Ser Asn Leu Ile Val Glu Ser
 210 215 220
 Asp Lys Lys Thr Ala Asp Trp Ser Lys Ile Thr Lys Leu Leu Lys Ser
 225 230 235 240

 Leu Asp Thr Gly Glu Asp Ile Glu Lys Tyr Leu Asp Val Asp Ser Val
 245 250 255
 Leu Lys Asn Ile Ala Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Leu Asp Ser Tyr
 260 265 270
 Gln Gly Ser Phe Ala His Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Gln Asp Gly Val
 275 280 285
 Phe Ser Met Leu Pro Trp Asp Phe Asn Met Ser Phe Gly Gly Phe Ser
 290 295 300

 Gly Phe Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ile Ala Ile Asp Glu Pro Thr Thr
 305 310 315 320
 Gly Asn Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ile Ser Ser Leu Leu Lys Asn Glu
 325 330 335
 Thr Tyr Lys Thr Lys Tyr His Lys Tyr Leu Glu Glu Ile Val Thr Lys
 340 345 350
 Tyr Leu Asp Ser Asp Tyr Leu Glu Asn Met Thr Thr Lys Leu His Asp
 355 360 365

 Met Ile Ala Ser Tyr Val Lys Glu Asp Pro Thr Ala Phe Tyr Thr Tyr
 370 375 380
 Glu Glu Phe Glu Lys Asn Ile Thr Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Asp
 385 390 395 400
 Asn Lys Gly Phe Gly Asn Lys Gly Phe Asp Asn Asn Asn Ser Asn Asn
 405 410 415
 Ser Asp Ser Asn Asn Asn Ser Asn Ser Glu Asn Lys Arg Ser Gly Asn
 420 425 430

 Gln Ser Asp Glu Lys Glu Val Asn Ala Glu Leu Thr Ser Ser Val Val
 435 440 445
 Lys Ala Asn Thr Asp Asn Glu Thr Lys Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ser

450 455 460
 Glu Ser Lys Asn Asn Thr Asp Lys Asp Lys Ser Gly Asn Asp Asn Asn
 465 470 475 480
 Gln Lys Leu Glu Gly Pro Met Gly Lys Gly Gly Lys Ser Ile Pro Gly
 485 490 495

 Val Leu Glu Val Ala Glu Asp Met Ser Lys Thr Ile Lys Ser Gln Leu
 500 505 510
 Ser Gly Glu Thr Ser Ser Thr Lys Gln Asn Ser Gly Asp Glu Ser Ser
 515 520 525
 Ser Gly Ile Lys Gly Ser Glu Lys Phe Asp Glu Asp Met Ser Gly Met
 530 535 540
 Pro Glu Pro Pro Glu Gly Met Asp Gly Lys Met Pro Pro Gly Met Gly
 545 550 555 560

 Asn Met Asp Lys Gly Asp Met Asn Gly Lys Asn Gly Asn Met Asn Met
 565 570 575
 Asp Arg Asn Gln Asp Asn Pro Arg Glu Ala Gly Gly Phe Gly Asn Arg
 580 585 590
 Gly Gly Gly Ser Val Ser Lys Thr Thr Thr Tyr Phe Lys Leu Ile Leu
 595 600 605
 Gly Gly Ala Ser Met Ile Ile Met Ser Ile Met Leu Val Gly Val Ser
 610 615 620

 Arg Val Lys Arg Arg Arg Phe Ile Lys Ser Lys
 625 630 635
 <210> 46
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Clostridium difficile
 <400> 46
 Met Lys Ser Val Asp Leu Tyr Ser Asp Val Tyr Ile Glu Lys Tyr Phe
 1 5 10 15
 Asn Arg Asp Lys Val Met Glu Val Asn Ile Glu Ile Asp Glu Ser Asp
 20 25 30

Leu Lys Asp Met Asn Glu Asn Ala Ile Lys Glu Glu Phe Lys Val Ala
 35 40 45

Lys Val Thr Val Asp Gly Asp Thr Tyr Gly Asn Val Gly Ile Arg Thr
 50 55 60

Lys Gly Asn Ser Ser Leu Ile Ser Val Ala Asn Ser Asp Ser Asp Arg
 65 70 75 80

Tyr Ser Tyr Lys Ile Asn Phe Asp Lys Tyr Asn Thr
 85 90

<210> 47

<211> 101

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 47

Met Val Thr Gly Asp Leu Tyr Lys Ser Asp Glu Gly Ser Ser Leu Gln

1 5 10 15

Tyr Lys Gly Asp Asp Pro Glu Ser Tyr Ser Asn Leu Ile Val Glu Ser
 20 25 30

Asp Lys Lys Thr Ala Asp Trp Ser Lys Ile Thr Lys Leu Leu Lys Ser
 35 40 45

Leu Asp Thr Gly Glu Asp Ile Glu Lys Tyr Leu Asp Val Asp Ser Val
 50 55 60

Leu Lys Asn Ile Ala Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Leu Asp Ser Tyr

65 70 75 80

Gln Gly Ser Phe Ala His Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Gln Asp Gly Val
 85 90 95

Phe Ser Met Leu Pro
 100

<210> 48

<211> 101

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 48

Met Ser Lys Thr Ile Lys Ser Gln Leu Ser Gly Glu Thr Ser Ser Thr
1 5 10 15
Lys Gln Asn Ser Gly Asp Glu Ser Ser Ser Gly Ile Lys Gly Ser Glu
20 25 30
Lys Phe Asp Glu Asp Met Ser Gly Met Pro Glu Pro Pro Glu Gly Met
35 40 45
Asp Gly Lys Met Pro Pro Gly Met Gly Asn Met Asp Lys Gly Asp Met
50 55 60
Asn Gly Lys Asn Gly Asn Met Asn Met Asp Arg Asn Gln Asp Asn Pro
65 70 75 80
Arg Glu Ala Gly Gly Phe Gly Asn Arg Gly Gly Gly Ser Val Ser Lys
85 90 95
Thr Thr Thr Tyr Phe
100
<210> 49
<211> 677
<212> PRT
<213> Clostridium difficile
<400> 49
Met Val Ser Lys Glu Ile Asn Met Arg Arg Asn Thr Lys Leu Leu Thr
1 5 10 15
Thr Gly Ile Leu Ser Met Ala Ile Val Ala Pro Thr Met Ala Phe Ala
20 25 30
Thr Glu Ser Asn Ala Met Glu Asn Asn Ala Asp Leu Asn Ile Asn Leu
35 40 45
Glu Lys Lys Ser Ile Val Leu Gly Ser Lys Ser Lys Val Ser Val Lys
50 55 60
Phe Lys Glu Lys Pro Asp Ala Asp Ser Ile Thr Leu Lys Tyr Lys Cys
65 70 75 80
Tyr Asp Met Pro Leu Asn Thr Thr Leu Asn Tyr Asn Gln Ser Thr Gly
85 90 95

Ala Tyr Glu Gly Thr Ile Asn Tyr Asn Gln Asp Pro Glu Tyr Leu Asn

100 105 110

Val Trp Glu Leu Gln Gly Ile Thr Ile Asn Ser Lys Asn Asn His Lys

115 120 125

Thr Leu Asn Arg Gln Asp Leu Glu Lys Leu Gly Leu Asn Leu Lys Asp

130 135 140

Tyr Asn Val Thr Gln Glu Cys Ile Ile Glu Asp Ile Thr Ser Arg Lys

145 150 155 160

Asp Val Asn Lys Tyr Leu Arg Lys Thr Ser Ser Pro Ile Thr Glu Leu

165 170 175

Thr Gly Ser Asp Arg Tyr Glu Thr Ala Val Lys Ile Ser Lys Glu Gly

180 185 190

Trp Lys Asn Gly Ser Asp Lys Val Val Ile Ile Asn Gly Asp Val Ser

195 200 205

Ile Asp Gly Ile Ile Ser Thr Pro Leu Ala Thr Thr Tyr Asn Ala Pro

210 215 220

Ile Leu Leu Val Glu Lys Asn Asn Val Pro Asn Ser Val Lys Ser Glu

225 230 235 240

Leu Lys Arg Leu Asn Pro Lys Asp Ile Ile Ile Ile Gly Asp Glu Asn

245 250 255

Ala Ile Ser Lys Thr Thr Ala Asn Gln Ile Lys Ser Thr Val Asn Ala

260 265 270

Ser Gln Thr Arg Leu Asn Gly Ser Asn Arg Tyr Glu Thr Ser Leu Leu

275 280 285

Ile Ala Lys Glu Ile Asp Lys Asn His Asp Val Glu Lys Val Tyr Ile

290 295 300

Thr Asn Ala Asn Gly Gly Glu Val Asp Ala Leu Thr Ile Ala Ala Lys

305 310 315 320

Ala Gly Gln Asp Lys Gln Pro Ile Ile Leu Thr Asp Lys Asp Ser Ile

325 330 335

Thr Asp Asn Thr Tyr Lys Trp Leu Lys Ser Glu Asp Leu Gln Asn Ala

340 345 350
Tyr Phe Ile Gly Gly Pro Gln Met Ile Ser Thr Asn Val Ile Asn Lys

355 360 365
Val Asn Gly Ile Thr Lys Asp Ser Val Thr Asn Asn Arg Val Tyr Gly

370 375 380
Ala Asp Arg His Glu Thr Asn Ala Asn Val Ile Lys Lys Phe Tyr Thr

385 390 395 400
Asp Asp Glu Leu Glu Ala Val Leu Val Ala Lys Ser Asp Val Leu Val

405 410 415
Asp Ala Leu Ala Ala Gly Pro Leu Ala Ala Asn Leu Lys Ser Pro Ile

420 425 430
Leu Ile Thr Pro Lys Thr Tyr Val Ser Ala Tyr His Lys Asp Asn Leu

435 440 445
Glu Ala Lys Ser Ala Asn Lys Val Tyr Lys Ile Gly Gly Gly Leu Thr

450 455 460
Ser Lys Val Met Ser Ser Ile Ala Ser Ser Leu Ser Lys His Asn Thr

465 470 475 480
Thr Pro Thr Glu Pro Gly Asn Ser Gly Gly Lys Thr Val Met Ile Asp

485 490 495
Pro Gly His Gly Gly Ser Ala Pro Gly Asn Ser Ser Gly Gly Met Ile

500 505 510
Glu Lys Asp Tyr Asn Leu Asn Thr Ser Leu Ala Thr Thr Glu Tyr Leu

515 520 525
Arg Ser Lys Gly Phe Asn Val Ile Met Thr Arg Asp Thr Asp Lys Thr

530 535 540
Leu Ser Leu Gly Asn Arg Thr Ala Leu Ser Asn Ser Leu Lys Pro Asp

545 550 555 560
Leu Phe Thr Ser Ile His Tyr Asn Gly Ser Thr Asn Lys Gln Gly His

565 570 575
Gly Val Glu Val Phe Tyr Lys Leu Lys Asp Lys Asn Gly Gly Thr Thr

580 585 590

Lys Thr Val Ala Thr Asn Ile Leu Asn Arg Ile Leu Glu Lys Phe Lys
 595 600 605
 Leu Thr Asn Arg Gly Ile Lys Thr Arg Val Leu Pro Ser Asp Ser Thr
 610 615 620
 Lys Asp Tyr Leu Tyr Val Leu Arg Ser Asn Asp Met Pro Ala Val Leu
 625 630 635 640
 Val Glu Cys Ala Phe Leu Asp Asn Glu Asn Asp Met Ser Leu Ile Asn
 645 650 655
 Ser Ser Ala Lys Val Lys Glu Met Gly Thr Gln Ile Gly Lys Gly Ile
 660 665 670
 Glu Asp Ser Leu Lys
 675
 <210
 > 50
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Clostridium difficile
 <400> 50
 Met Asp Lys Asn His Asp Val Glu Lys Val Tyr Ile Thr Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Val Asp Ala Leu Thr Ile Ala Ala Lys Ala Gly Gln Asp
 20 25 30
 Lys Gln Pro Ile Ile Leu Thr Asp Lys Asp Ser Ile Thr Asp Asn Thr
 35 40 45
 Tyr Lys Trp Leu Lys Ser Glu Asp Leu Gln Asn Ala Tyr Phe Ile Gly
 50 55 60
 Gly Pro Gln Met Ile Ser Thr Asn Val Ile Asn Lys Val Asn Gly Ile
 65 70 75 80
 Thr Lys Asp Ser Val Thr Asn Asn Arg Val Tyr Gly Ala Asp Arg His
 85 90 95
 Glu Thr Asn Ala Asn
 100