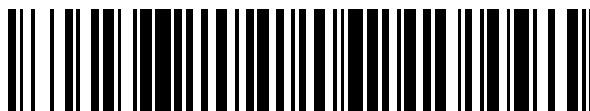


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 183**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2012 PCT/US2012/028632**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12122540**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2012 E 12754934 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2683729**

54 Título: **Aptámeros para diagnóstico de Clostridium difficile**

30 Prioridad:
10.03.2011 US 201161451227 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.08.2017

73 Titular/es:
**SOMALOGIC, INC. (100.0%)
2945 Wilderness Place
Boulder, CO 80301, US**

72 Inventor/es:
**OCHSNER, URS;
KATILIUS, EVALDAS y
JANJIC, NEBOJSA**

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 629 183 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aptámeros para diagnóstico de *Clostridium difficile*

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere generalmente al campo de los ácidos nucleicos y más particularmente a aptámeros capaces de unirse a toxinas producidas por *C. difficile* y útiles para ensayos de diagnóstico para *C. difficile*. La divulgación se refiere adicionalmente a materiales y métodos para diagnosticar contaminación e infección por *C. difficile*.

Antecedentes

La siguiente descripción proporciona un sumario de información relevante para la presente divulgación y no es una admisión de que cualquiera de la información proporcionada o publicaciones a las que se hace referencia en el presente documento sea técnica anterior para la presente divulgación.

La infección por *C. difficile* (CDI) ha aumentado en todo el mundo en los últimos años. Las consecuencias clínicas y económicas son sustanciales, con más de medio millón de casos y gastos estimados de 3,2 mil millones de dólares al año para la gestión de CDI solamente en Estados Unidos (O'Brien, J.A., *et al.*, Infect. Control Hosp. Epidemiol., 2007. 28 (11): p. 1219-27).

La CDI es una afección inflamatoria del intestino grueso caracterizada por diarrea y su gravedad puede variar de leve a fulminante. Los síndromes de CDI más graves son colitis pseudomembranosa y megacolon tóxico. La mayoría de los casos de CDI se producen en pacientes de edades avanzadas en un entorno hospitalario o en hogares para personas de edades avanzadas. La hospitalización, sin embargo, aumenta el riesgo de colonización también para adultos sanos. En Estados Unidos, las hospitalizaciones por CDI y las tasas de mortalidad de casos relacionados con la CDI se duplicaron entre 2000 y 2005. Se ha informado de una serie de brotes recientes en los que los casos de CDI eran principalmente de naturaleza clonal. Un tipo de cepa clasificado como BI/NAP1/027 fue responsable de más de la mitad de los casos y las características de esta cepa de "brote" epidémico son alta morbilidad y mortalidad, mayor resistencia a los antibióticos (por ejemplo, fluoroquinolonas), la presencia de un gen variante de *tcdC*, e hiperproducción de toxinas (Freeman, J., *et al.*, Clin. Microbiol. Rev., 2010. 23 (3): p. 529-49; Rupnik, M., M.H. Wilcox, y D.N. Gerding, Nat. Rev. Microbiol., 2009. 7 (7): p. 526-36).

El uso de antibióticos es un fuerte factor de predisposición a la CDI debido a la alteración de la flora intestinal normal que de otra forma suprime a *C. difficile*. La ingestión de esporas es la principal vía de colonización del intestino humano por *C. difficile*. Las esporas son extremadamente resistentes a los desinfectantes y pueden persistir en el entorno durante más de 12 meses con poca pérdida de viabilidad o patogenicidad. Las esporas también están implicadas en el 20-25 % de los casos de CDI que recaen después del tratamiento. Los regímenes de tratamiento actuales para la CDI son vancomicina o metronidazol. Varios agentes nuevos y más selectivos que prometen reducir las tasas de recurrencia de CDI se encuentran en desarrollo clínico.

La inflamación del revestimiento intestinal está causada por dos toxinas (toxina A y toxina B) que se expresan por algunas cepas de *C. difficile*. La Toxina A y la toxina B son glucosiltransferasas que se dirigen a pequeñas GTPasas hospedadoras pequeñas diana en la superfamilia Ras. Están codificadas en el locus de patogenicidad de 19,6 kb y las cepas que carecen de estos genes de toxina no son patógenas. Las cepas toxinogénicas se pueden clasificar adicionalmente en toxinotipos de acuerdo con la variabilidad de secuencias dentro del locus de patogenicidad. Ambas toxinas contribuyen a la CDI, como se muestra mediante el uso de mutantes isogénicos que producen tanto toxina A como toxina B solas y fueron citotóxicos *in vitro* y virulentos *in vivo* (Kuehne, S.A., *et al.*, Nature, 2010. 467 (7316): p. 711-3). Se está estudiando un prototipo de vacuna basado en toxinas A y B inactivadas (toxoides) y anticuerpos monoclonales anti-toxina para su eficacia en la prevención de la CDI recurrente.

La Toxina A y la toxina B son toxinas grandes de PM ~ 300 kDa, relacionadas estructuralmente, y consisten en un dominio catalítico amino-terminal (glucosiltransferasa), un dominio C80 de peptidasa central, un dominio de translocación y múltiples repeticiones de la horquilla β carboxi-terminal. Se ha demostrado que el mecanismo de acción de las toxinas clostridiales implica la unión de estas repeticiones de la horquilla β a los carbohidratos presentes en la superficie de las células gastrointestinales, escisión mediada por endopeptidasa e internalización del dominio catalítico (Pfeifer, G., *et al.*, J. Biol. Chem., 2003. 278 (45): p. 44535-41).

Algunas cepas de *C. difficile* producen una toxina binaria que posee actividad de ADP-ribosiltransferasa. Aunque su papel en la patogénesis no está claro, la presencia de toxina binaria es un buen marcador para la cepa BI/NAP1/027 epidémica del brote. La toxina binaria se compone de dos subunidades, que son la cadena de toxina A binaria de actina ADP-ribosiltransferasa y la cadena de toxina B binaria formadora de poros. Se segregan a partir de las células bacterianas como polipéptidos separados y tienen el potencial de combinarse para formar una citotoxina potente que se ha mostrado que elimina las células Vero (Sundriyal, A., *et al.*, Protein Expr. Purif., 2010. 74 (1): p. 42-8).

El diagnóstico rápido y preciso de la CDI es importante para el cuidado del paciente, control de la infección y vigilancia. Las toxinas A y B de *C. difficile* son de alta relevancia en diagnóstico clínico ya que son dianas suficientemente específicas de patógenos y la demostración de su presencia es importante para el diagnóstico de la IDC. Todos los ensayos de diagnóstico de IDC usados en la actualidad son cualitativos y pertenecen a uno de tres tipos: (i) ensayo de citotoxinas (cultivo tisular), (ii) ensayos de toxinas no moleculares (EIA), y (iii) ensayos moleculares (PCR).

El ensayo de citotoxina basado en cultivo tisular se considera el criterio de referencia, pero es incómodo y no se realiza de forma rutinaria en la mayoría de los laboratorios clínicos. En esencia, este ensayo detecta la toxina de *C. difficile* a través del efecto citopático de la toxina en cultivo celular que se puede neutralizar con anti-sueros específicos. El ensayo de citotoxicidad detecta tan poco como 10 pg de toxina B y es el ensayo confirmatorio recomendado para presentaciones de 510(k) en el "Draft Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff Establishing the Performance Characteristics of *In Vitro* Diagnostic Devices for the Detection of *Clostridium difficile*" que fue lanzado en noviembre de 2010 por la FDA, <http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm234868.htm>. 2010.

Los ensayos moleculares para CDI están disponibles en varias compañías de diagnóstico. El ensayo Cepheid GeneXpert™ se basa en PCR multiplex (*tcdB*, *cdt*, *tcdC*), con sensibilidad y especificidad anunciadas de > 95 % y tiempo para el resultado de 30 min. El ensayo Meridian illumigene™ de *C. difficile* detecta la presencia de la región productora de toxina por amplificación de bucle isotérmico y anunció que proporcionaba resultados en una hora. El ensayo BD GeneOhm™ *Cdiff* es un método de PCR en tiempo real para la detección del gen de la toxina B (*tcdB*) directamente a partir de muestras de heces, con un tiempo de protocolo de ensayo de menos de dos horas, sensibilidad de un 93,8 % y especificidad de un 95,5 %. Gen-Probe ofrece el ensayo Prodesse ProGastro Cd que también detecta el gen de la toxina B (*tcdB*) por PCR y se anuncia que proporciona resultados en tres horas con una sensibilidad de un 91,7 % y especificidad de un 94,7 %.

También hay disponibilidad de ensayos no moleculares para detección de toxina de *C. difficile* en muestras de heces de pacientes de los que se sospecha que tienen CDI. Los inmunoensayos enzimáticos (EIA) son los métodos de detección rápida más ampliamente usados para antígeno común y antígenos de toxina A/B de *C. difficile*, pero los EIA tradicionales tienen sensibilidad y especificidad modestas. Entre los EIA de tipo pocillo, el ensayo de las Toxinas A/B Meridian Premier™ y el ensayo Techlab TOX A/B II™ se consideran los ELISA de mejor funcionamiento y detectan ambas toxinas en muestras de heces en menos de 1 hora. Estos ensayos tenían una sensibilidad de aproximadamente un 80 % y una especificidad de un 98 % cuando se someten a ensayo independientemente. Los anticuerpos de la toxina B para las Toxinas A/B de Premier™ (Meridian) y para las TOX A/B II™ de *C. difficile* (TechLab) eran capaces de detectar 125 pg y 250 pg de toxina B, respectivamente, cuando se sometían a ensayo lado a lado (Novak-Weekley, S.M. y M.H. Hollingsworth. Clin Vaccine Immunol, 2008. 15 (3): p. 575-8). Otros muchos ensayos de EIA de tipo pocillo se han llevado al mercado (antígeno de *C. difficile* de GA, Toxina A/B de R-Biopharm's Ridascreen™; Toxina A/B de ProSpect™ de Remel) pero se usan con menos frecuencia en Estados Unidos. Los ensayos de EIA de Membrana realizados con dispositivos de flujo lateral son los ensayos de Toxinas A y B de Meridian ImmunoCard™, los de Techlab Tox A/B Quik Chek™, y los de Remel Xpect™.

En el mercado existe un ensayo automatizado, VIDAS™ de Toxina A y B de *C. difficile* de bioMérieux, que combina el ensayo de toxina y la identificación basada en cultivo con la tira API® 20A y formación de fanáticos bacterianos automatizados con el sistema DiversiLab®.

Los ensayos de toxina de *C. difficile* basados en aptámeros, como los EIA, tienen la ventaja con respecto a los ensayos moleculares de que no requieren grandes inversiones en equipos o reactivos caros. Los aptámeros tienen varias ventajas distintas con respecto a los anticuerpos que se usan en la actualidad en ensayos no moleculares, tales como los EIA: los aptámeros generalmente tienen menor peso molecular, proporcionan mayores capacidades de multiplexación (baja reactividad cruzada, condiciones de ensayo universalmente aplicables), estabilidad química (al calor, secado y disolventes, renaturalización reversible), proporcionan facilidad de fabricación de reactivos, rendimiento coherente de lote a lote y se pueden producir con un coste más bajo. Cohen *et al.*, 2010, Infect Control Hosp Epidemiol 31 (5): 431-455 desvela métodos para la detección de la toxina B de *C. difficile* toxina.

Los aptámeros se pueden generar contra prácticamente cualquier diana de proteína, no solo las toxinas A/B, sino también la toxina binaria para la que no hay ensayo basado en anticuerpos de lo que los Solicitantes son conscientes. Los métodos de detección y lectura pueden ser los mismos que para los ensayos existentes, minimizando de ese modo las necesidades de equipos y requisitos de entrenamiento. Gold *et al.*, 2010, PLoS ONE 5:12, e15004 desvela métodos para producir aptámeros.

Sumario

La presente invención proporciona aptámeros y métodos que usan aptámeros tal como se define en las reivindicaciones.

La presente divulgación proporciona diversos aptámeros que se unen a toxinas producidas por *C. difficile*. Se incluyen kits de diagnóstico y métodos de diagnóstico que comprenden tales aptámeros; y métodos para preparar y usar tales aptámeros.

- 5 Los aptámeros proporcionados se unen a la toxina A, toxina B, cadena de toxina A binaria, o cadena de toxina B binaria de *C. difficile*. Se proporcionan métodos de diagnóstico para detectar una toxina de *C. difficile* que comprende un aptámero para una toxina producida por *C. difficile* que incluyen, pero no se limitan a ensayos de captación, ensayos de transferencia puntual, ensayos de PCR y ensayos de sándwich.
- 10 Los aptámeros proporcionados comprenden opcionalmente al menos una pirimidina modificada en una posición C-5 y pueden comprender al menos una modificación química adicional. También se proporcionan aptámeros y métodos para identificar o producir tales aptámeros que se unen a una toxina de *C. difficile* que tienen una tasa de disociación lenta de la toxina. Además se proporcionan aptámeros y métodos para identificar o producir tales aptámeros que se unen a una toxina de *C. difficile* que tiene resistencia a nucleasas.

15

Breve descripción de las figuras

- La Figura 1A ilustra la estructura cristalina de la toxina A de *C. difficile* (rTcdA) que incluye cinco repeticiones de unión a receptor carboxi-terminales (Ho, J.G., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005. 102 (51): p. 18373-8); muestra la purificación de la toxina A como una proteína etiquetada recombinante purificada a través de cromatografía por afinidad con Ni-NTA agarosa y resina de Estrep-Tactina usando la etiqueta de His y la etiqueta de Estrep de la toxina A; y amplificación por PCR de la porción correspondiente del gen de toxina que codifica la toxina A (*tcdA*). La Figura 1B ilustra la estructura cristalina del dominio catalítico amino-terminal de la toxina B de *C. difficile* (rTcdB) (Reinert, D.J. *et al.*, (2005), J. Mol. Biol. 351: 973-981); muestra la purificación de la toxina B como una proteína etiquetada recombinante purificada a través de cromatografía por afinidad con Ni-NTA agarosa y resina de Estrep-Tactina usando la etiqueta de His y la etiqueta de Estrep de la toxina B; y amplificación por PCR de la porción correspondiente del gen de toxina que codifica la toxina B (*tcdB*). La Figura 1C ilustra la estructura cristalina de la cadena de toxina A binaria de longitud completa de *C. difficile* (rCdtA) (Sundriyal, A., *et al.*, J Biol. Chem. 2009. 284 (42): p. 28713-9); muestra la purificación de la cadena de toxina A binaria como una proteína etiquetada recombinante purificada a través de cromatografía por afinidad con Ni-NTA agarosa y resina de Estrep-Tactina usando la etiqueta de His y la etiqueta de Estrep de la cadena de toxina A binaria; y amplificación por PCR de la porción correspondiente del gen de toxina que codifica la cadena de toxina A binaria (*cdtA*). La Figura 1D ilustra la estructura modelada de la cadena de toxina B binaria de cadena completa de *C. difficile* (rCdtB); muestra la purificación de la cadena de toxina B binaria como una proteína etiquetada recombinante purificada a través de cromatografía por afinidad con Ni-NTA agarosa y resina de Estrep-Tactina usando la etiqueta de His y la etiqueta de Estrep de la cadena de toxina B binaria; y amplificación por PCR de la porción correspondiente del gen de toxina que codifica la cadena de toxina B binaria (*cdtB*).
- La Figura 2A ilustra los resultados de un ensayo de captación de toxina A recombinante y nativa usando aptámeros de toxina A que muestran alta especificidad con respecto a la toxina B o BSA de la proteína de control. La Figura 2B ilustra los resultados de un ensayo de captación de toxina B recombinante y nativa usando aptámeros de toxina B que muestran alta especificidad con respecto a la toxina A recombinante y nativa de las proteínas de control. La Figura 2C ilustra los resultados de un ensayo de captación de toxina binaria con aptámeros para la cadena de toxina A binaria que muestran especificidad para la cadena de toxina A binaria con respecto a la cadena de toxina B binaria y la proteína de control BSA.
- La Figura 2D ilustra los resultados de un ensayo de captación de toxina A recombinante y nativa así como de toxina B recombinante y nativa con aptámeros aleatorios que no muestran proteínas presentes en la fracción de captación.
- La Figura 3A ilustra la detección de toxina A de *C. difficile* en transferencias puntuales usando aptámeros biotinilados para toxina A y conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.
- La Figura 3B ilustra la detección de toxina B de *C. difficile* en transferencias puntuales usando aptámeros biotinilados para toxina B y conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.
- La Figura 4A ilustra la detección cuantitativa de la toxina A mediante cPCR de aptámeros eluidos a partir de una muestra que contiene aptámeros que forman complejos con la toxina A en la que los aptámeros no unidos se han retirado antes de la medición cuantitativa de los aptámeros como una medición indirecta para la toxina A. La Figura 4B ilustra la detección cuantitativa de la toxina B mediante cPCR de aptámeros eluidos a partir de una muestra que contiene aptámeros que forman complejos con la toxina B en la que los aptámeros no unidos se han retirado antes de la medición cuantitativa de los aptámeros como una medición indirecta para la toxina B.
- La Figura 5A ilustra resultados de detección de toxina A de *C. difficile* mediante ensayo de sándwich en placa con estreptavidina (aptámero-diana-anticuerpo), usando aptámeros biotinilados para la toxina A y anticuerpos monoclonales de ratón para la toxina A detectados con anticuerpos de cabra-anti-ratón. La Figura 5B ilustra resultados de detección de toxina B de *C. difficile* mediante ensayo de sándwich en placa con estreptavidina (aptámero-diana-anticuerpo), usando aptámeros biotinilados para la toxina B y anticuerpos monoclonales de ratón para la toxina B detectados con anticuerpos de cabra-anti-ratón.
- La Figura 6 ilustra resultados de detección de toxina A y B de *C. difficile* mediante ensayos de sándwich (anticuerpo-diana-aptámero) en nitrocelulosa, en los que los anticuerpos monoclonales se aplican puntualmente en nitrocelulosa y se secan al aire, se bloquean, se añaden nuestras que contienen toxina A o B, se lavan, se

añaden aptámeros biotinilados, se lavan, y se desarrollan con conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

La Figura 7 ilustra resultados de detección de cadena de toxina A binaria de *C. difficile* en un ensayo de sándwich (aptámero-diana-aptámero) con un primer aptámero biotinilado para la cadena de toxina A binaria unido a perla de estreptavidina, adición de diana, y adición de un segundo aptámero radioetiquetado para la

5

cadena de toxina A binaria. La Figura 8 ilustra etapas relevantes de un ensayo de Toma 1 - Toma 2.

La Figura 9 ilustra ejemplos de pirimidinas modificadas en la posición C-5 que se ponen usar en los métodos para preparar los aptámeros que se describen en el presente documento.

10 Descripción detallada

A continuación se hará referencia con detalle a realizaciones representativas de la invención. Aunque la invención se describirá en conjunto con las realizaciones enumeradas, se entenderá que la invención no pretende quedar limitada por esas realizaciones. Por el contrario, la invención pretende cubrir todas las alternativas, modificaciones, y

15

equivalentes que se pueden incluir dentro del alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones.

Un experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, que se podrían usar y que están dentro del alcance de la práctica de la presente invención. La presente invención no se limita en modo alguno a los métodos y materiales descritos.

20

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende alguien con una experiencia habitual en la materia o materias a las que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o ensayo de la invención se puede usar cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los que se describen en el presente documento, los métodos, dispositivos y materiales preferentes se describen a continuación.

25

Todas las publicaciones, documentos de patentes publicados, y solicitudes de patentes citados en la presente divulgación son indicativos del nivel de experiencia en la materia o materias a las que pertenece la divulgación.

30

Como se usa en la presente divulgación, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", y "el" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo, y se usan indistintamente con "al menos uno" y "uno o más". Por lo tanto, la referencia a "un aptámero" incluye mezclas de aptámeros, y similares.

35

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" representa una modificación o variación insignificante del valor numérico de modo que la función básica del elemento al que se refiere el valor numérico no cambia.

40

Como se usa en el presente documento, la expresión "clon de aptámero" se refiere a un aptámero de una secuencia de nucleótidos en particular. En el presente documento los clones de aptámero se identifican por "ID de Aptámero N.º" así como por "SEQ ID NO:".

45

Como se usa en el presente documento, "molécula competidora" y "competidor" se usan indistintamente para hacer referencia a cualquier molécula que pueda formar un complejo no específico con una molécula no diana. Una "molécula competidora" o "competidor" es un conjunto de copias de un tipo de especies de molécula. Las "moléculas competidoras" o "competidores" se refieren a más de uno de tal conjunto de moléculas. Las moléculas competidoras incluyen oligonucleótidos, polianiones (por ejemplo, heparina, ADN de esperma de salmón de una sola hebra, y polidextranos (por ejemplo, sulfato de dextrano)), polímeros de fosfodiéster abásico, dNTPs, y pirofosfato. En el caso de una estimulación cinética que use un competidor, el competidor también puede ser cualquier molécula que pueda formar un complejo no específico con un aptámero. Las moléculas competidoras de este tipo incluyen policaciones (por ejemplo, espermina, espermidina, polilisina, y poliarginina) y que aminoácidos (por ejemplo, arginina y lisina).

50

Como se usa en las tablas 4, 6, 8 y 10, el término "recuento" se refiere al número de apariciones de una secuencia de aptámeros en particular entre todos los aptámeros que se clonaron y se secuenciaron a partir de una combinación que resultó a partir de SELEX.

55

Como se usa en el presente documento, la expresión "transferencia puntual" se refiere a un ensayo en el que una mezcla que contiene la molécula diana a detectar se aplica directamente en un sustrato como un punto seguido de detección de la presencia de la molécula diana mediante una molécula de afinidad, en el que la molécula de afinidad puede ser, pero no se limita a, un aptámero o anticuerpo.

60

El término "cada" cuando se usa en el presente documento para hacer referencia a una pluralidad de artículos pretende hacer referencia a al menos dos de los artículos. No es necesario que todos los artículos que forman la pluralidad satisfagan una limitación adicional asociada.

65

Como se usa en el presente documento, los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "incluye", "contiene", "que contiene", y cualquier variación de los mismos, pretenden cubrir una inclusión no exclusiva, de modo que un proceso, método, subproducto del proceso, o composición de materia que comprende, incluye, o contiene un elemento o lista de elementos no incluye solamente sus elementos sino que puede incluir otros elementos no enumerados de forma expresa o inherentes a tal proceso, método, subproducto del proceso, o composición de materia.

Como se usa en el presente documento, "secuencia consenso", cuando se usa en referencia a una serie de ácidos nucleicos relacionados, se refiere a una secuencia de nucleótidos que refleja la elección más común de base en cada posición en la secuencia en la que la serie de ácidos nucleicos relacionados se ha sometido a análisis matemático y/o de secuencias.

Como se usa en el presente documento, el término "nucleótido" se refiere a un ribonucleótido o un desoxirribonucleótido, o una forma modificada del mismo, así como un análogo del mismo. Los nucleótidos incluyen especies que incluyen purinas (por ejemplo, adenina, hipoxantina, guanina, y sus derivados y análogos) así como pirimidinas (por ejemplo, citosina, uracilo, timina, y sus derivados y análogos).

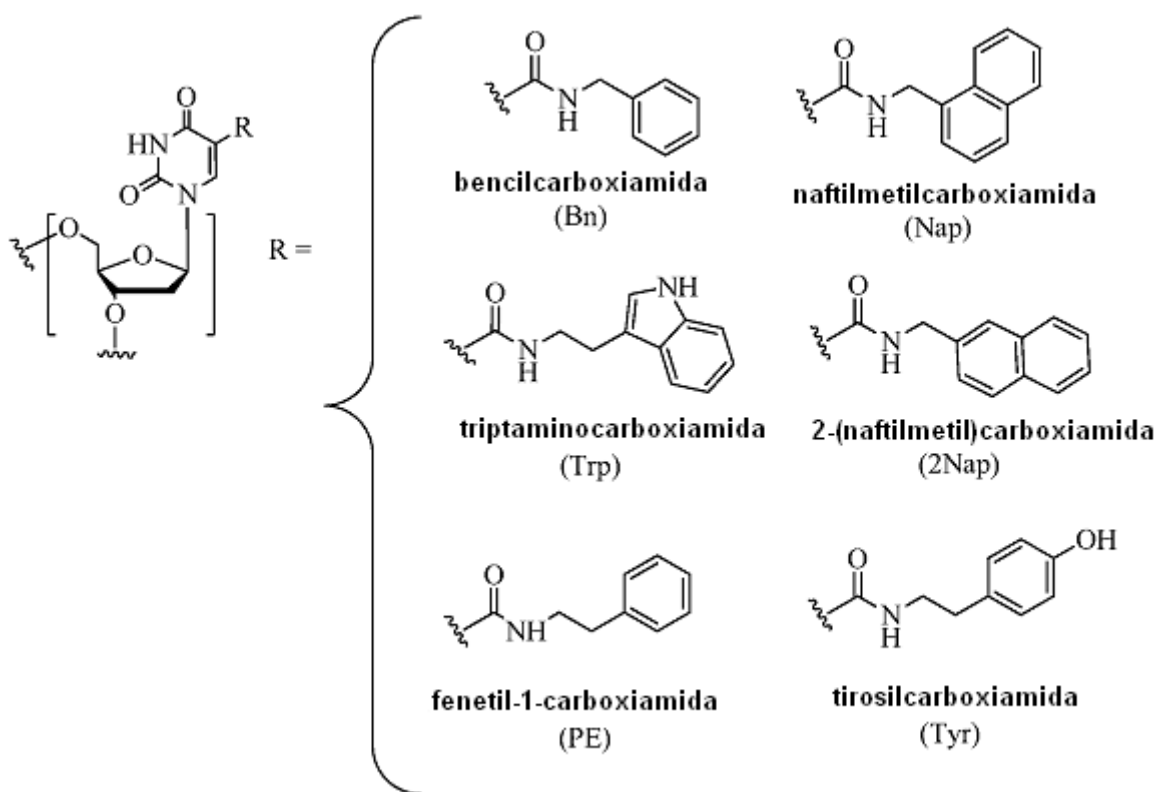
Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico", "oligonucleótido", y "polinucleótido" se usan indistintamente para hacer referencia a un polímero de nucleótidos e incluyen ADN, ARN, híbridos de ADN/ARN y modificaciones de estos tipos de ácidos nucleicos, oligonucleótidos y polinucleótidos, en los que está incluida la unión de diversas entidades o restos en las unidades de nucleótidos en cualquier posición. Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido", y "ácido nucleico" incluyen moléculas de dos o de una hebra así como moléculas de triple hélice. Ácido nucleico, oligonucleótido, y polinucleótido son términos más amplios que el término aptámero y, por lo tanto, los términos ácido nucleico, oligonucleótido, y polinucleótido incluyen polímeros de nucleótidos que son aptámeros pero los términos ácido nucleico, oligonucleótido, y que polinucleótido no se limitan a los aptámeros.

Como se usa en el presente documento, los términos "modificar", "modificado", "modificación", y cualquier variación de los mismos, cuando se usa en referencia a un oligonucleótido, se refiere a que al menos una de las cuatro bases de nucleótidos constituyentes (*es decir*, A, G, T/U, y C) del oligonucleótido es un análogo o éster de un nucleótido de origen natural. En algunas realizaciones, el nucleótido modificado confiere resistencia a nucleasa para el oligonucleótido. Una pirimidina con una sustitución en la posición C-5 es un ejemplo de un nucleótido modificado. Las modificaciones pueden incluir modificaciones de la estructura principal, metilaciones, combinaciones no habituales de emparejamiento de bases tales como las isobases isocitidina e isoguanidina, y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones en las posiciones 3' y 5', tales como protección. Otras modificaciones pueden incluir sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones de internucleótido tales como, por ejemplo, os que presentan uniones sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y los que presentan uniones con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), los que presentan intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen agentes quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), los que contienen agentes alquilantes, y los que presentan uniones modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo habitualmente presentes en el azúcar de un nucleótido se pueden sustituir por un grupo fosfonato o un grupo fosfato; se pueden proteger con grupos protectores convencionales; o se pueden activar para preparar uniones adicionales a nucleótidos adicionales o a un soporte sólido. Los grupos OH 5' y 3' terminales se pueden fosforilar o sustituir con aminas, restos de grupos de protección orgánicos de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, polímeros de polietilenglicol (PEG) que en una realización varían de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 kDa, polímeros de PEG que en otra realización varían de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 kDa, u otro polímero biológico o sintético hidrófilo o hidrófobo. En una realización, las modificaciones se realizan en la posición C-5 de las pirimidinas. Estas modificaciones se pueden producir a través de un enlace de amida directamente en la posición C-5 o mediante otros tipos de enlaces.

Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de los azúcares ribosa o desoxirribosa que por lo general se conocen en la técnica, incluyendo 2'-O-metil-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósido abásico tales como metil ribósidi. Como se ha indicado anteriormente, uno o más enlaces fosfodiéster se pueden sustituir por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen realizaciones en las que el fosfato está sustituido por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("dithioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o sin sustituir que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenoilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La sustitución de las formas análogas de azúcares, purinas, y pirimidinas puede ser ventajosa para diseñar un producto final, al igual que lo pueden ser las estructuras de cadena principal alternativas tales como una cadena principal de poliamida, por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "pirimidina modificada en la posición C-5" se refiere a una pirimidina con una modificación en la posición C-5 que incluye, pero no se limita a, los restos que se ilustran en la

Figura 9. Los ejemplos de una pirimidina modificada en la posición C-5 incluyen los que se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.719.273 y 5.945.527. Los ejemplos de una modificación en la posición C-5 incluyen sustitución de desoxiuridina en la posición C-5 con un sustituyente seleccionado independientemente entre: bencilcarboxiamida (como alternativa bencilaminocarboxamido) (Bn), naftilmetilcarboxiamida (como alternativa naftilmetilaminocarboxamido) (Nap), triptaminocarboxiamida (como alternativa triptaminocarboxamido) (Trp), tirosilcarboxiamida (como alternativa tirosilaminocarboxamido) (Tyr), 2-naftilmetilcarboxiamida (como alternativa 2-naftilmetilaminocarboxamido) (2Nap) y fenetil-1-carboxiamida (como alternativa fenetil-1-aminocarboxamido) (PE), como se ilustra inmediatamente a continuación.



10

Las modificaciones químicas de una pirimidina modificada en la posición C-5 también se pueden combinar con, de forma individual o en cualquier combinación, modificaciones de azúcar en la posición 2', modificaciones en aminas exocíclicas, y sustitución de 4-tiouridina y similares.

15

Las pirimidinas modificadas en la posición C-5 representativas incluyen: 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU), 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU), 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU), 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-tirosilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TyrdU), 5-(N-tirosilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-tirosilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-(2-naftilmetil)carboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NapdU), 5-(N-(2-naftilmetil)carboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-(2-naftilmetil)carboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-fenetil-1-carboxiamida)-2'-desoxiuridina (PEdU), 5-(N-fenetil-1-carboxiamida)-2'-O-metiluridina, o 5-(N-fenetil-1-carboxiamida)-2'-fluorouridina.

25

Si estuviera presente, una modificación en la estructura de nucleótidos se puede impartir antes o después del ensamblaje de un polímero. Una secuencia de nucleótidos se puede interrumpir mediante componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de su polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de etiquetado.

30

Como se usa en el presente documento, la expresión "al menos una pirimidina", cuando se refiere a modificaciones de un ácido nucleico, se refiere a uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, o todas las pirimidinas en el ácido nucleico, lo que indica que cualquiera o todas las apariciones de cualquiera o todos de C, T, o U en un ácido nucleico pueden estar modificados o no.

35

Como se usa en el presente documento, las expresiones "estimulación por vía cinética" y "estimulación cinética" se refieren a un proceso de enriquecimiento para un complejo de afinidad de aptámero de un conjunto de complejos

que incluye un complejo de afinidad de aptámero y complejos no específicos, mediante aplicación de presión cinética y haciendo uso de las diferentes características de afinidad de los componentes de tales clases de complejos, incluyendo tasas de disociación. Una estimulación cinética por lo general da como resultado un aumento de la especificidad, ya que los complejos de aptámero-no diana por lo general son reducidos en comparación con los complejos de aptámero-diana. Como se usa en el presente documento, la expresión "presión cinética" se refiere a un medio para proporcionar una oportunidad para disociación natural de complejos y/o inhibir la nueva unión de moléculas que se disocian a partir de un complejo de forma natural. La presión cinética se puede aplicar mediante la adición de una molécula competidora, o mediante difusión de la muestra, o mediante lavados extensos cuando los complejos se unen a un soporte sólido, o mediante cualquier otro medio conocido por un experto en la materia. Como observará alguien con una experiencia habitual en la materia, dado que una estimulación cinética depende de las tasas de disociación diferentes de los complejos de afinidad de aptámero y los complejos de aptámero-no diana, la duración de la estimulación cinética se elige de modo que retenga una proporción elevada de los complejos de afinidad de aptámero a la vez que se reduce sustancialmente el número de complejos de aptámero-no diana. Para que una estimulación cinética sea eficaz, preferentemente la tasa de disociación para el complejo de afinidad de aptámero es significativamente menor que las que se usan para complejos de aptámero-no diana. Dado que un aptámero se prevé seleccionar para que incluya propiedades en particular, se pueden diseñar componentes de un complejo de afinidad de aptámero para que tengan una tasa de disociación comparativamente baja, es decir, una tasa de disociación lenta.

Como se usa en el presente documento, "ligando de ácido nucleico", "aptámero", y "clon" se usan indistintamente para hacer referencia a un ácido nucleico de origen natural que tiene una acción deseada en una molécula diana. Una acción deseable incluye, pero no se limita a, unión de la diana, cambio de la diana por vía catalítica, reacción con la diana de un modo que modifique o altere y la diana o la actividad funcional de la diana, unión covalente a la diana (como en un inhibidor suicida), y facilitar la reacción entre la diana y otra molécula. En una realización, la acción es afinidad de unión específica para una molécula diana, siendo tal molécula diana una estructura química tridimensional distinta de un polinucleótido que se une al ligando de ácido nucleico a través de un mecanismo que es independiente del emparejamiento de bases de Watson/Crick o formación de triple hélice triple, en el que el aptámero no es un ácido nucleico que tenga la función fisiológica conocida de ser unido por la molécula diana. Los aptámeros para una diana dada incluyen ácidos nucleicos que se identifican a partir de una mezcla de ácidos nucleicos candidata, en la que el aptámero es un ligando de la diana, mediante un método que comprende: (a) poner en contacto la mezcla candidata con la diana, en el que los ácidos nucleicos que tienen un aumento de la afinidad hacia la diana con respecto a otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata se pueden repartir desde el resto de la mezcla candidata; (b) repartir los ácidos nucleicos con un aumento de la afinidad del resto de la mezcla candidata; y (c) amplificar los ácidos nucleicos con un aumento de la afinidad para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en ligandos, en la que se identifican los aptámeros de la molécula diana. Se reconoce que las interacciones de afinidad son una cuestión de grado; sin embargo, en este contexto, la "afinidad de unión específica" de un aptámero hacia su diana se refiere a que el aptámero se une a su diana generalmente con un grado de afinidad mucho más elevado que con el que se une a otros componentes no diana en una mezcla o muestra. Un "aptámero" o "ligando de ácido nucleico" es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos en particular. Un aptámero puede incluir cualquier número adecuado de nucleótidos. Los "aptámeros" se refieren a más de uno de tales conjuntos de moléculas. Los aptámeros diferentes pueden tener cualquiera del mismo número o diferente de nucleótidos. Los aptámeros pueden ser ADN o ARN y pueden ser de una hebra, de doble hebra, o pueden contener regiones de doble hebra o de triple hebra.

Como se usa en el presente documento, los códigos de ambigüedad de nucleótidos de la IUPAC son: M = A o C; R = A o G; W = A o N; S = C o G; Y = C o N; K = G o N (N representa el dU modificado específico de la combinación).

Como se usa en el presente documento, "meseta" se refiere a una región de una curva de unión (en la que la fracción de aptámeros unidos aumenta hacia arriba del eje y, y la concentración de diana aumenta hacia la derecha en el eje x) en el que se alcanza una meseta ya que el aumento de la concentración de la diana producido un cambio relativamente pequeño en la fracción de aptámeros unidos a la diana. El porcentaje de la meseta proporcionado en el presente documento es con respecto a un 100 % de los aptámeros que se están uniendo la diana.

Como se usa en el presente documento, "proteína" se usa como sinónimo de "péptido", "polipéptido", o "fragmento de péptido". Un polipéptido, proteína, péptido, o fragmento de péptido "purificados" está sustancialmente libre de material celular otras proteínas contaminantes de la célula, tejido, o fuente sin células a partir de la que se obtiene la secuencia de aminoácidos, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetiza por vía química.

Como se usa en el presente documento, "ensayo de captación" se refiere a un ensayo que comprende la retirada de una diana de la solución en el que la retirada se consigue mediante una interacción de afinidad selectiva entre la diana y una segunda molécula. En una realización, la molécula que tiene afinidad selectiva hacia la molécula diana es un aptámero. En otra realización, la molécula que tiene afinidad selectiva hacia la molécula diana es un anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, "PCR" se refiere a una reacción en cadena de la polimerasa usada para amplificar el número de copias de una molécula de ADN. Como se usa en el presente documento, "cPCR" o "PCR cuantitativa" se refiere a una reacción en cadena de la polimerasa que se usa para amplificar y cuantificar de forma simultánea una molécula de ADN se tiene como diana.

5 Como se usa en el presente documento, "ensayo de sándwich" se refiere a un ensayo capaz de detectar la presencia o de cuantificar la cantidad de una diana de interés. El ensayo requiere el uso de dos moléculas de afinidad diferentes capaces de unir dos regiones que no se solapan (no competitivas), diferentes en una diana de interés. Las moléculas de afinidad incluyen, pero no se limitan a, aptámeros y anticuerpos.

10 Como se usa en el presente documento, "sustrato" se refiere a una superficie, que incluye, pero no se limita a, la superficie de una placa, perla o membrana a la que se puede unir una molécula orgánica. Un sustrato puede comprender o no una primera molécula que media la unión de una segunda molécula, tal como un sustrato que comprende estreptavidina que puede mediar la unión de biotina o una molécula que comprende un resto de biotina. En una realización, el sustrato es nitrocelulosa.

15 Como se usa en el presente documento, "muestra de ensayo" se refiere a una muestra en la que se desconocen la presencia o cantidad de uno o más analitos de interés (por ejemplo, toxina A, toxina B, cadena de toxina A binaria, o cadena de toxina B binaria de *C. difficile*) y que se pueden determinar en un ensayo, preferentemente un ensayo de diagnóstico que comprende un aptámero. En una realización, la muestra de ensayo puede ser una "muestra biológica" tal como material biológico celular y no celular, que incluye, pero no se limita a, muestras de tejido, sangre, suero, otros fluidos corporales y excrementos. En otra realización, la muestra de ensayo puede ser una "muestra ambiental" que se puede obtener a partir de agua, suelo o aire. Normalmente no es necesario ningún cultivo anterior para la detección de *C. difficile* en muestras ambientales.

25 El método SELEX

Los términos "SELEX" y "proceso SELEX" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia generalmente a una combinación de (1) la selección de ácidos nucleicos que interactúan con una molécula diana de una manera deseable, por ejemplo la unión a una proteína con afinidad elevada, con (2) la amplificación de esos ácidos nucleicos seleccionados. El proceso SELEX se puede usar para identificar aptámeros con afinidad elevada hacia una molécula o biomarcador diana específicos.

30 El SELEX generalmente incluye preparar una mezcla de ácidos nucleicos candidata, unir la mezcla candidata a la molécula diana deseada para formar un complejo de afinidad, separar los complejos de afinidad de los ácidos nucleicos candidatos no unidos, separar y aislar el ácido nucleico del complejo de afinidad, purificar el ácido nucleico, e identificar una secuencia de aptámeros específica. El proceso puede incluir múltiples rondas para refinar adicionalmente la afinidad del aptámero seleccionado. El proceso puede incluir etapas de amplificación en uno o más puntos en el proceso. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.475.096, titulado "Nucleic Acid Ligands". El proceso SELEX se puede usar para generar un aptámero que se una de forma covalente a su diana así como a un aptámero que no se une de forma covalente a su diana. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.705.337 titulado "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX".

35 El proceso SELEX se puede usar para identificar aptámeros de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas en el aptámero, tales como, por ejemplo, mejora de la estabilidad *in vivo* o mejora de las características de administración. Los ejemplos de las modificaciones de este tipo incluyen sustituciones químicas en las posiciones de la ribosa y/o fosfato y/o base. Los aptámeros identificados con el proceso SELEX que contienen nucleótidos modificados se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.660.985, titulado "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides", que describe oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos modificados químicamente en las posiciones 5' y 2' de las pirimidinas. El documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.580.737, véase anteriormente, describe aptámeros altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con 2'-amino (2'-NH₂), 2'-fluoro (2'-F), y/o 2'-O-metilo (2'-OMe). Véase también, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2009/0098549, titulada "SELEX and PHOTOSELEX", que describe bibliotecas de ácidos nucleicos que tienen propiedades físicas y químicas ampliadas y su uso en SELEX y photoSELEX.

40 Los oligonucleótidos resistentes a nucleasa incluyen al menos una pirimidina modificada en la posición C-5 con un grupo seleccionado entre los que se establecen en la Figura 9. En diversas realizaciones, las modificaciones incluyen sustitución de desoxiuridina en la posición C-5 con un sustituyente seleccionado independientemente entre: bencilcarboxiamida (Bn), naftilmetilcarboxiamida (Nap), triptaminocarboxiamida (Trp), tirosilcarboxiamida (Tyr), (2-naftilmetil)carboxiamida (2Nap), y fenetil-1-carboxiamida (PE) como se ha ilustrado anteriormente.

45 El SELEX también se puede usar para identificar aptámeros que tengan características deseables de tasa de disociación. Véase también la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2009/0004667, titulada "Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates", que describe métodos de SELEX mejorados para generar

aptámeros que se puedan unir a moléculas diana. Se describen métodos para producir aptámeros y fotoaptámeros que tienen tasas de disociación más lentas a partir de sus respectivas moléculas diana. Los métodos implican poner en contacto la mezcla candidata con la molécula diana, permitir que se produzca la formación de complejos de ácido nucleico-diana, y realizar un proceso de enriquecimiento con una tasa de disociación lenta en el que los complejos de ácido nucleico-diana con tasas de disociación rápidas se disocian y no se reforman, mientras que los complejos con tasas de disociación lentas permanecen intactos. Además, los métodos incluyen el uso de nucleótidos modificados en la producción de mezclas candidatas de ácidos nucleicos para generar aptámeros con un aumento del rendimiento de la tasa de disociación (Véase la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2009/0098549, titulada "SELEX and PhotoSELEX").

En el presente documento "diana" o "molécula diana" o "diana" hace referencia a cualquier compuesto sobre el que puede actuar un ácido nucleico de una forma deseable. Una molécula diana puede ser una proteína, péptido, ácido nucleico, carbohidrato, lípido, polisacárido, glicoproteína, hormona, receptor, antígeno, anticuerpo, virus, patógeno, sustancia tóxica, sustrato, metabolito, análogo en estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, colorante, nutriente, factor de crecimiento, célula, tejido, cualquier arqueo fragmento de cualquiera de los mencionados anteriormente, etc., sin limitación. Prácticamente cualquier efector químico o biológico puede ser una diana adecuada. Las moléculas de cualquier tamaño pueden servir como dianas. Una diana también se puede modificar de ciertas maneras para aumentar la probabilidad o fuerza de una interacción entre la diana y el ácido nucleico. Una diana también puede incluir cualquier variación menor de un compuesto o molécula en particular, tal como, en el caso de una proteína, por ejemplo, variaciones menores en la secuencia de aminoácidos, formación de enlace disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de etiquetado, que no adquiere de forma sustancial la identidad de la molécula. Una "molécula diana" o "diana" es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula o estructura multimolecular que es capaz de unirse a un aptámero. Las "moléculas diana" o "dianas" se refieren a más de uno de tales conjuntos de moléculas. Las realizaciones del proceso SELEX en las que la diana es un péptido se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.376.190, titulado "Modified SELEX Processes Without Purified Protein". En el presente caso, las dianas incluyen toxina A, toxina B, toxina binaria, cadena de toxina A binaria, o cadena de toxina B binaria de *C. difficile*.

Métodos para Identificar o Producir un Aptámero para una toxina de *C. difficile*

La presente divulgación proporciona métodos para identificar o producir un aptámero de tasa de disociación lenta que se une a una toxina producida por *C. difficile* en el que dicha toxina se selecciona entre toxina A, toxina B, cadena de toxina A binaria, y cadena de toxina B binaria, método que comprende:

- (a) preparar una mezcla de ácidos nucleicos candidata, en el que la mezcla candidata comprende ácidos nucleicos modificados en los que una, varias o todas las pirimidinas en al menos uno, o cada, ácido nucleico de la mezcla candidata comprende una modificación química en una posición C-5; (b) poner en contacto la mezcla candidata con una diana que es dicha toxina producida por *C. difficile* y exponer la mezcla candidata a un proceso de enriquecimiento con tasa de disociación lenta, en el que los ácidos nucleicos que tienen una tasa de disociación lenta de la diana con respecto a otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata se unen a la diana, formando complejos de ácido nucleico-molécula diana; (c) repartir los ácidos nucleicos con una tasa de disociación lenta de la mezcla candidata; y (d) amplificar los ácidos nucleicos con una tasa de disociación lenta para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con secuencias de ácidos nucleicos que son capaces de unirse a la molécula diana con una tasa de disociación lenta, de modo que se pueda identificar un aptámero de tasa de disociación lenta para la molécula diana. Los métodos para identificar o producir un aptámero con una tasa de disociación lenta para una toxina de *C. difficile* pueden comprender al menos una pirimidina en la que una modificación química en una posición C-5 se elige independientemente entre al menos una de las modificaciones mostradas en la Figura 9. Los métodos para identificar o producir un aptámero con una tasa de disociación lenta para una toxina de *C. difficile* pueden comprender al menos una pirimidina en la que una modificación química en una posición C-5 se elige independientemente entre bencilcarboxiamida, naftilmetilcarboxiamida, triptaminocarboxiamida, tirosilcarboxiamida, 2-naftilmetilcarboxiamida y fenetil-1-carboxiamida. Los métodos para identificar o producir un aptámero con una tasa de disociación lenta para una toxina de *C. difficile* pueden comprender al menos una modificación química adicional, en los que dicha al menos una modificación química adicional es una sustitución química en una o más posiciones seleccionadas independientemente entre el grupo que consiste en una posición de ribosa, una posición de desoxirribosa, una posición de fosfato, y una posición de base. Además, los métodos para identificar o producir un aptámero con una tasa de disociación lenta para una toxina de *C. difficile* pueden comprender al menos una modificación química adicional, en los que dicha al menos una modificación química adicional se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en una modificación de azúcar en la posición 2', una modificación en la posición 2'-amino (2'-NH₂), en la posición 2'-fluoro (2'-F), en la posición 2'-O-metilo (2'-OMe) en una amina exocíclica de citosina, una sustitución de 5-bromouracilo, una sustitución de 5-bromodesoxiuridina, una sustitución de 5-bromodesoxicitidina, una modificación de estructura principal, metilación, una protección en la posición 3', y una protección en la posición 5'. Los métodos para identificar o producir un aptámero con una tasa de disociación lenta para una toxina de *C. difficile* pueden comprender un proceso de enriquecimiento con una tasa de disociación lenta seleccionado entre incubación de una mezcla candidata con una molécula

competidora, dilución de una mezcla candidata, o dilución de una mezcla candidata en presencia de una molécula competidora.

5 La presente divulgación también proporciona métodos para producir un aptámero que tenga una tasa de disociación
lenta a partir de una toxina producida por *C. difficile* en el que dicha toxina se selecciona entre toxina A, toxina B,
cadena de toxina A binaria, y cadena de toxina B binaria, comprendiendo dicho método la etapa de preparar o
sintetizar un aptámero basándose en una secuencia de ácidos nucleicos identificada mediante un proceso que
comprende las etapas de: (a) preparar una mezcla de ácidos nucleicos candidata, en el que la mezcla candidata
10 comprende ácidos nucleicos modificados en los que una, varias o todas las pirimidinas en al menos uno, o cada,
ácido nucleico de la mezcla candidata comprende una modificación química en una posición C-5; (b) poner en
contacto la mezcla candidata con una diana que es dicha toxina producida por *C. difficile* y exponer la mezcla
candidata a un proceso de enriquecimiento con tasa de disociación lenta, en la que los ácidos nucleicos que tienen
una tasa de disociación lenta de la molécula diana con respecto a otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata se
15 unen a la molécula diana, formando complejos de ácido nucleico-molécula diana; (c) repartir los ácidos nucleicos con
una tasa de disociación lenta de la mezcla candidata; y (d) amplificar los ácidos nucleicos con una tasa de
disociación lenta para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con secuencias de ácidos nucleicos que
son capaces de unirse a la molécula diana con una tasa de disociación lenta, de modo que se identifica un aptámero
de tasa de disociación lenta para la molécula diana. Tales métodos para producir un aptámero que tenga una tasa
20 de disociación lenta a partir de una toxina de *C. difficile* pueden comprender al menos una pirimidina en la que una
modificación química en una posición C-5 se elige independientemente entre al menos una de las modificaciones
mostradas en la Figura 9. Los métodos para producir un aptámero que tenga una tasa de disociación lenta a partir
de una toxina de *C. difficile* pueden comprender al menos una pirimidina en la que una modificación química en una
posición C-5 se elige independientemente entre bencilcarboxiamida, naftilmetilcarboxiamida, triptaminocarboxiamida,
tirosilcarboxiamida, 2-naftilmetilcarboxiamida y fenetil-1-carboxiamida. Los métodos para producir un aptámero que
25 tenga una tasa de disociación lenta a partir de una toxina de *C. difficile* pueden comprender al menos una
modificación química adicional, en los que dicha al menos una modificación química adicional es una sustitución
química en una o más posiciones seleccionadas independientemente entre el grupo que consiste en una posición de
ribosa, una posición de desoxirribosa, una posición de fosfato, y una posición de base. Además, los métodos para
producir un aptámero que tenga una tasa de disociación lenta a partir de una toxina de *C. difficile* pueden
30 comprender al menos una modificación química adicional, en los que dicha al menos una modificación química
adicional se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en una modificación de azúcar en la
posición 2', una modificación en la posición 2'-amino (2'-NH₂), en la posición 2'-fluoro (2'-F), en la posición 2'-O-
metilo (2'-OMe) en una amina exocíclica de citosina, una sustitución de 5-bromouracilo, una sustitución de 5-
bromodesoxiuridina, una sustitución de 5-bromodesoxicitidina, una modificación de estructura principal, metilación,
35 una protección en la posición 3', y una protección en la posición 5'. Los métodos para producir un aptámero que
tenga una tasa de disociación lenta a partir de una toxina de *C. difficile* pueden comprender un proceso de
enriquecimiento con una tasa de disociación lenta seleccionado entre incubación de una mezcla candidata con una
molécula competidora, dilución de una mezcla candidata, o dilución de una mezcla candidata en presencia de una
molécula competidora.

40 La presente divulgación también proporciona métodos para producir un aptámero resistente a nucleasa que se una a
una toxina producida por *C. difficile* en el que dicha toxina se selecciona entre toxina A, toxina B, cadena de toxina A
binaria, y cadena de toxina B binaria, método que comprende preparar o sintetizar dicho aptámero resistente a
nucleasa basándose en una secuencia de ácidos nucleicos identificada mediante un proceso que comprende: (a)
45 preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos modificados, en el que la mezcla candidata comprende ácidos
nucleicos modificados en los que al menos una pirimidina en al menos uno, o en cada, ácido nucleico de la mezcla
candidata comprende una modificación química en una posición C-5; (b) poner en contacto la mezcla candidata con
una diana que es dicha toxina producida por *C. difficile*, en la que los ácidos nucleicos que tienen un aumento de la
afinidad hacia la molécula diana con respecto a otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata se unen a la molécula
50 diana, formando complejos de ácido nucleico-molécula diana; (c) repartir los ácidos nucleicos con un aumento de la
afinidad del resto de la mezcla candidata; y (d) amplificar los ácidos nucleicos con un aumento de la afinidad para
producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con secuencias de ácidos nucleicos que son capaces de unirse
a la molécula diana con un aumento de la afinidad y que son resistentes a nucleasa, de modo que se identifica un
aptámero resistente a nucleasa para la molécula diana. Los métodos para producir un aptámero resistente a
55 nucleasa para una toxina de *C. difficile* pueden comprender al menos una pirimidina en la que una modificación
química en una posición C-5 se elige independientemente entre al menos una de las modificaciones mostradas en la
Figura 9. Los métodos para producir un aptámero resistente a nucleasa para una toxina de *C. difficile* pueden
comprender al menos una pirimidina en la que una modificación química en una posición C-5 se elige
independientemente entre bencilcarboxiamida, naftilmetilcarboxiamida, triptaminocarboxiamida, tirosilcarboxiamida,
60 2-naftilmetilcarboxiamida y fenetil-1-carboxiamida. Los métodos para producir un aptámero resistente a nucleasa
para una toxina de *C. difficile* pueden comprender al menos una modificación química adicional, en los que dicha al
menos una modificación química adicional es una sustitución química en una o más posiciones seleccionadas
independientemente entre el grupo que consiste en una posición de ribosa, una posición de desoxirribosa, una
posición de fosfato, y una posición de base. Además, los métodos para producir un aptámero resistente a nucleasa
65 para una toxina de *C. difficile* pueden comprender al menos una modificación química adicional, en los que dicha al
menos una modificación química adicional se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en una

modificación de azúcar en la posición 2', una modificación en la posición 2'-amino (2'-NH₂), en la posición 2'-fluro (2'-F), en la posición 2'-O-metilo (2'-OMe) en una amina exocíclica de citosina, una sustitución de 5-bromouracilo, una sustitución de 5-bromodesoxiuridina, una sustitución de 5-bromodesoxicidina, una modificación de estructura principal, metilación, una protección en la posición 3', y una protección en la posición 5'.

5 Aptámeros

10 Los aptámeros para toxinas de *C. difficile* de la presente divulgación se identificaron usando el método SELEX mejorado para identificar aptámeros que tienen tasas de disociación lentas, como se ha descrito anteriormente. La forma de las toxinas de *C. difficile* usadas en el proceso de selección eran toxinas recombinantes preparadas mediante amplificación por PCR de fragmentos de genes deseados de ADN genómico de *C. difficile*, como se describe en el Ejemplo 1.

15 El SELEX se realizó usando proteínas etiquetadas con His purificadas obtenidas a partir de la sobreexpresión de fragmentos clonados de genes de toxina de *C. difficile*. Se usaron bibliotecas de secuencias aleatorias de 40meros que contenían uno de seis nucleótidos modificados, 5-tirosilcarboxiamida-dU (TyrDU), 5-bencilcarboxiamida-dU (BndU), 5-naftilmetilcarboxiamida-dU (NapdU), 5-triptaminocarboxiamida-dU (TrpdU), 5-(2-naftilmetil)carboxiamida (2NapdU), o 5-fenetil-1-carboxiamida (PEdU) en lugar de dU. Se realizaron siete u ocho rondas de selección, y se aplicó una estimulación cinética con sulfato de dextrano en las rondas 2-8. Las combinaciones de aptámeros
20 obtenidas después de la última ronda de SELEX se sometieron a ensayo para afinidad hacia sus dianas en ensayos de unión con filtro, y se determinaron las K_d y las mesetas (Tabla 2). Todas las combinaciones con una afinidad suficiente (K_d de ~10 nM o inferior) se clonaron y se determinaron las secuencias de al menos 48 clones por combinación.

25 Aptámeros para la Toxina A

Para la toxina A, la combinación de aptámero 4943 (TrpdU) presentaba una afinidad excelente con una K_d = 2,42 nM. Las combinaciones 4936 (TyrDU) y 4939 (NapdU) eran activas, con las K_d de 11,5 y 10,8 nM, respectivamente. Las combinaciones 5564 (2NapdU) y 5577 (2NapdU) presentaban buena afinidad, con las K_d de
30 4,63 y 6,40 nM. Para la toxina A, la combinación de aptámero 5570 (PEdU) era la mejor, con una K_d = 1,61 nM. Los clones de aptámero con buenas afinidades para la toxina A se aislaron de todas las combinaciones con nucleótidos modificados con TrpdU, TyrDU, NapdU, 2NapdU, y PEdU (Tabla 3); las secuencias de aptámeros de toxina A de *C. difficile* se enumeran en la Tabla 4. Además para identificar clones de aptámero con buena afinidad de unión para la toxina A, se identificaron secuencias consenso entre tales clones de aptámero.

35 El clon de aptámero líder de la combinación 5570 (PEdU) era 5570-54, con K_d = 0,12 nM para la toxina A recombinante y K_d = 6,91 nM para la toxina A nativa.

40 Algunos clones de aptámero demostraron una afinidad excelente tanto para la toxina A recombinante como para la toxina A nativa, por ejemplo el clon de aptámero 4943-51 (TrpdU) tenía K_d = 1,23 nM para la toxina A recombinante y K_d = 1,78 nM para la toxina A nativa; el clon de aptámero 5564-49 (2NapdU) tenía K_d = 1,13 nM para la toxina A recombinante y K_d = 1,78 nM para la toxina A nativa.

45 Algunos clones de aptámero demostraban una disminución de la afinidad relativamente pequeña entre la toxina A recombinante y la toxina A nativa, por ejemplo el clon de aptámero 5577-1 (2NapdU) tenía K_d = 1,59 nM para la toxina A recombinante y K_d = 4,97 nM para la toxina A nativa; el clon de aptámero 5577-3 (2NapdU) tenía K_d = 1,73 nM para la toxina A recombinante y K_d = 5,52 nM para la toxina A nativa; el clon de aptámero 4943-60 (TrpdU) tenía K_d = 2,65 nM para la toxina A recombinante y K_d = 4,57 nM para la toxina A nativa.

50 Además para identificar clones de aptámero con buena afinidad de unión para la toxina A, se identificaron secuencias consenso entre tales clones de aptámero.

Aptámeros para la Toxina B

55 Las afinidades de los aptámeros para la toxina B eran generalmente muy buenas y se correlacionaban bien entre el dominio catalítico amino-terminal de 68,8 kDa del fragmento de la toxina B de *C. difficile* que se había usado en SELEX y la toxina B de longitud completa, nativa de 270 kDa. Los clones de aptámero con K_d sub-nanomolares para la toxina B se aislaron de todas las combinaciones con nucleótidos modificados con TyrDU, BndU, NapdU, TrpdU, 2NapdU y PEdU (Tabla 5); las secuencias de aptámeros de toxina B de *C. difficile* se enumeran en la Tabla 6, con
60 los mejores clones mostrados en negrita.

Los de afinidad más elevada aptámeros eran clones con nucleótidos modificados con NapdU o TrpdU. Cinco aptámeros demostraban K_d muy bajas de < 0,1 nM: El clon de aptámero 4940-1 (NapdU) tenía K_d = 0,04 nM para la toxina B recombinante y K_d = 0,06 para la toxina B nativa; el clon de aptámero 4940-23 (NapdU) tenía K_d = 0,07 nM para la toxina B recombinante y K_d = 0,09 nM para la toxina B nativa; el clon de aptámero 4940-27 (NapdU) tenía
65 K_d = 0,10 nM para la toxina B recombinante y K_d = 0,09 nM para la toxina B nativa; el clon de aptámero 4944-5

(TrpdU) tenía $K_d = 0,08$ nM para la toxina B recombinante y $K_d = 0,09$ nM para la toxina B nativa; y el clon de aptámero 4944-30 (TrpdU) tenía $K_d = 0,06$ nM para la toxina B recombinante y $K_d = 0,08$ nM para la toxina B nativa. Los clones de aptámero con buenas afinidades para la toxina B se aislaron de todas las combinaciones con nucleótidos modificados con TrpdU, TyrDU, NapdU, 2NapdU, BndU y PEdU (Tabla 5); las secuencias de aptámeros de toxina B de *C. difficile* se enumeran en la Tabla 6. Además para identificar clones de aptámero con buena afinidad de unión para la toxina B, se identificaron secuencias consenso entre tales clones de aptámero.

Aptámeros para la Toxina Binaria (cadena A)

El SELEX con la cadena de toxina A binaria (CdtA) recombinante proporcionó aptámeros activos con nucleótidos modificados con TrpdU, 2NapdU y PEdU (Tabla 7). Las secuencias y los patrones de secuencias comunes de aptámeros de CdtA se muestran en la Tabla 8. La clonación de la combinación 4758 (TrpdU) desveló el clon 4758-6 que comprendía un 18 % de las secuencias en esa combinación y presentaba buena afinidad ($K_d = 0,86$ nM) hacia la toxina binaria de CdtA. Se obtuvieron veinte secuencias de combinaciones de 2NapdU, la mayoría de ellas con afinidad subnanomolar, y se identificaron varios patrones de secuencias entre estos clones de 2NapdU. Las combinaciones de PEdU contenían cinco aptámeros activos.

Aptámeros para la Toxina Binaria (cadena B)

El SELEX con la cadena de toxina B binaria (CdtB) recombinante proporcionó aptámeros activos con nucleótidos modificados con 2NapdU (Tabla 9). Las secuencias y los patrones de secuencias comunes de aptámeros de CdtB se muestran en la Tabla 10. El clon más activo era 5556-51 con $K_d = 1,68$ nM.

La presente divulgación proporciona aptámeros para toxinas producidas por *C. difficile* identificados usando el método SELEX y enumerados en las Tablas 4, 6, 8 y 10. Los aptámeros para las toxinas producidas por *C. difficile* que son sustancialmente homólogos a cualquiera de los aptámeros enumerados y que tienen una capacidad sustancialmente similar para unirse a la respectiva toxina producida por *C. difficile* como la de un aptámero seleccionado entre el grupo de aptámeros que se establecen en las Tablas 4, 6, 8 y 10 también están incluidos en la presente divulgación. Además, los aptámeros para la respectiva toxina producida por *C. difficile* que tienen sustancialmente la misma forma estructural que la de los aptámeros identificados en el presente documento y que tienen una capacidad sustancialmente similar para unirse a la respectiva toxina producida por *C. difficile* como la de un aptámero seleccionado entre el grupo de aptámeros que se establecen en las Tablas 4, 6, 8 y 10 también están incluidos en la presente divulgación.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un aptámero que se une de forma específica a una toxina producida por *C. difficile* e incluye una secuencia primaria de ácidos nucleicos. En una realización, la secuencia primaria de ácidos nucleicos se selecciona entre una secuencia desvelada en la Tabla 4, 6, 8, o 10. En otras realizaciones, la secuencia primaria de ácidos nucleicos se selecciona de modo que sea idéntica en al menos aproximadamente un 75 %, idéntica en al menos aproximadamente un 80 %, idéntica en al menos aproximadamente un 85 %, idéntica en al menos aproximadamente un 90 %, o idéntica en al menos aproximadamente un 95 % a la secuencia primaria de ácidos nucleicos desvelada en la Tabla 4, 6, 8 o 10.

Las expresiones "identidad de secuencias", "porcentaje de identidad de secuencias", "porcentaje de identidad", "% idéntica", "% de identidad", y variaciones de las mismas, cuando se usan en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos, se usan indistintamente para hacer referencia a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o que tienen un porcentaje de nucleótidos especificado que es el mismo, cuando se comparan y se alinean para correspondencia máxima, tal como se mide usando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Para comparaciones de secuencias, por lo general una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, y si fuera necesario se diseñan coordenadas de subsecuencias, y se diseñan parámetros de programa de algoritmo de secuencias. A continuación con el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad es secuencias para la secuencia o secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa diseñados. El alineamiento óptimo de las secuencias para su comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math., 1981. 2: 482, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol., 1970. 48: 443, mediante la búsqueda con el método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 1988. 85: 2444, mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección visual (véase generalmente, Ausubel, F. M. *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, pub. por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987)).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencias es el algoritmo usado en la herramienta de búsqueda de alineamientos local básica (en lo sucesivo en el presente documento "BLAST"), véase, por ejemplo Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 1990. 215: 403-410 y Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res., 1997. 15: 3389-3402. El software para realizar análisis con BLAST está disponible al público a través del

National Center for Biotechnology Information (en lo sucesivo en el presente documento "NCBI"). Los parámetros por defecto usados en la determinación de la identidad de secuencias usando el software disponible en NCBI, por ejemplo, BLASTN (para secuencias de nucleótidos) se describen en McGinnis *et al.*, Nucleic Acids Res., 2004. 32: W20-W25.

5 Como se usa en el presente documento, cuando se describe el porcentaje de identidad de un ácido nucleico, tal como un aptámero con respecto a una toxina producida por *C. difficile*, cuya secuencia es al menos, por ejemplo, idéntica en aproximadamente un 95 % a una secuencia de nucleótidos de referencia, tiene como intención que la secuencia de ácidos nucleicos sea idéntica a la secuencia de referencia excepto por que la secuencia de ácidos nucleicos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia de ácidos nucleicos deseada, cuya secuencia es al menos idéntica en aproximadamente un 95 % a una secuencia de ácidos nucleicos de referencia, hasta un 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden experimentar delección o sustitución con otro nucleótido, o un cierto número de nucleótidos hasta un 5 % del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia (denominada inserción en el presente documento). Estas mutaciones de la secuencia de referencia para generar la secuencia deseada se pueden producir mutaciones en las posiciones 5' o 3' terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas ya sea de forma individual entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. La secuencia de referencia (consulta) puede ser uno cualquiera de la secuencia de nucleótidos completa mostrada en la Tabla 4, 6, 8 o 10, o cualquier fragmento de cualquiera de estas secuencias.

25 En un aspecto, una secuencia consenso seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 11, 15, 23, 28, 32, 47, 66, 75, 83, 90, 95, 98, 110, 124, 125, 134, 139, 145, 151, 152 o 157 se puede modificar para que comprenda al menos una inserción, una delección y/o una transposición. En una realización, la secuencia consenso seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 11, 15, 23, 28, 32, 47, 66, 75, 83, 90, 95, 98, 110, 124, 125, 134, 139, 145, 151, 152 o 157 se modifica de modo que al menos un nucleótido se inserte en la secuencia consenso. En otra realización, una secuencia consenso seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 11, 15, 23, 28, 32, 47, 66, 75, 83, 90, 95, 98, 110, 124, 125, 134, 139, 145, 151, 152 o 157 se modifica de modo que al menos un nucleótido experimente delección de la secuencia consenso. En otra realización, una secuencia consenso seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 11, 15, 23, 28, 32, 47, 66, 75, 83, 90, 95, 98, 110, 124, 125, 134, 139, 145, 151, 152 o 157 se modifica de modo que al menos un nucleótido experimente transposición desde una posición en la secuencia consenso ha otra posición en la secuencia consenso. También se reconoce que una secuencia consenso seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 11, 15, 23, 28, 32, 47, 66, 75, 83, 90, 95, 98, 110, 124, 125, 134, 139, 145, 151, 152 o 157 se puede modificar para que comprenda una combinación de una o más inserciones, delecciones o transposiciones mientras que aún mantiene una afinidad adecuada con respecto a una toxina producida por *C. difficile* para que tenga utilidad en un ensayo de diagnóstico.

40 En diversas realizaciones, el aptámero para una toxina producida por *C. difficile* incluye una secuencia de nucleótidos contiguos que es idéntica a una secuencia de nucleótidos contiguos incluidos en cualquiera de las secuencias de nucleótidos mostradas en la Tabla 4, 6, 8 o 10. En diversas realizaciones, la secuencia de nucleótidos contiguos en el aptámero para una toxina producida por *C. difficile* puede incluir cualquier número de nucleótidos que sean idénticos al mismo número de nucleótidos en una secuencia de nucleótidos contiguos incluidos en cualquiera de las secuencias mostradas en la Tabla 4, 6, 8 o 10. En diversas realizaciones, la secuencia de nucleótidos contiguos en el aptámero para una toxina producida por *C. difficile* incluye una secuencia de aproximadamente 4 a aproximadamente 30 nucleótidos contiguos que es idéntica a una secuencia de de aproximadamente 4 a aproximadamente 30 nucleótidos contiguos incluidos en cualquiera de las secuencias mostradas en la Tabla 4, 6, 8 o 10. En una realización a modo de ejemplo, el aptámero para una toxina producida por *C. difficile* incluye una secuencia de 40 nucleótidos contiguos que es idéntica a una secuencia de 40 nucleótidos contiguos incluidos en cualquiera de las secuencias mostradas en la Tabla 4, 6, 8 o 10 que tiene 40 o más nucleótidos contiguos. En una realización a modo de ejemplo, el aptámero para una toxina producida por *C. difficile* incluye una secuencia de 30 nucleótidos contiguos que es idéntica a una secuencia de 30 nucleótidos contiguos incluida en cualquiera de las secuencias mostradas en la Tabla 4, 6, 8 o 10. En otra realización a modo de ejemplo, el aptámero para una toxina producida por *C. difficile* incluye una secuencia de 20 nucleótidos contiguos que es idéntica a una secuencia de 20 nucleótidos contiguos incluida en cualquiera de las secuencias mostradas en la Tabla 4, 6, 8 o 10. Además, en otra realización a modo de ejemplo, el aptámero para una toxina producida por *C. difficile* incluye una secuencia de 8 nucleótidos contiguos que es idéntica a una secuencia de 8 nucleótidos contiguos incluidos en cualquiera de las secuencias mostradas en la Tabla 4, 6, 8 o 10. Además, en otra realización a modo de ejemplo, el aptámero para una toxina producida por *C. difficile* incluye una secuencia de 4 nucleótidos contiguos que es idéntica a una secuencia de 4 nucleótidos contiguos incluidos en cualquiera de las secuencias mostradas en la Tabla 4, 6, 8 o 10.

65 En una realización, el aptámero para la toxina A se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-4, 6-10, 12-14, 16-22, 24-27, o 29-31. En otra realización más, el aptámero para la toxina A se obtiene a partir de una secuencia consenso seleccionada entre una cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 11, 15, 23 o 28. En una realización, el

aptámero para la toxina A es idéntico en al menos aproximadamente un 95 %, idéntico en al menos aproximadamente un 90 %, idéntico en al menos aproximadamente un 85 %, idéntico en al menos aproximadamente un 80 %, o idéntico en al menos aproximadamente un 75 % a cualquiera de las SEQ ID NO: 1-31. En otra realización, el aptámero para la toxina A incluye una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-31 o fragmentos de cualquiera de las mismas.

En una realización, el aptámero para la toxina B se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 33-46, 48-65, 67-74, 76-82, 84-89, 91-94, 96-97, o 99-108. En otra realización más, el aptámero para la toxina B se obtiene a partir de una secuencia consenso seleccionada entre una cualquiera de las SEQ ID NO: 32, 47, 66, 75, 83, 90, 95 y 98. En una realización, el aptámero para la toxina B es idéntico en al menos aproximadamente un 95 %, idéntico en al menos aproximadamente un 90 %, idéntico en al menos aproximadamente un 85 %, idéntico en al menos aproximadamente un 80 %, o idéntico en al menos aproximadamente un 75 % a cualquiera de las SEQ ID NO: 32-108. En otra realización, el aptámero para la toxina B incluye una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 32-108 o fragmentos de cualquiera de las mismas.

En una realización, el aptámero para la cadena de toxina A binaria se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 109, 111-123, 126-133, 135-138, 140-144, o 146-150. En otra realización más, el aptámero para la cadena de toxina A binaria se obtiene a partir de una secuencia consenso seleccionada entre una cualquiera de las SEQ ID NO: 110, 124-125, 134, 139, o 145. En una realización, el aptámero para la cadena de toxina A binaria es idéntico en al menos aproximadamente un 95 %, idéntico en al menos aproximadamente un 90 %, idéntico en al menos aproximadamente un 85 %, idéntico en al menos aproximadamente un 80 %, o idéntico en al menos aproximadamente un 75 % a cualquiera de las SEQ ID NO: 109-150. En otra realización, el aptámero para la cadena de toxina A binaria incluye una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 109-150 o fragmentos de cualquiera de las mismas.

En una realización, el aptámero para la cadena de toxina B binaria se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 153-156, 158-162. En otra realización más, el aptámero para la cadena de toxina B binaria se obtiene a partir de la secuencia consenso of SEQ ID NO: 151, 152 o 157. En una realización, el aptámero para la cadena de toxina B binaria es idéntico en al menos aproximadamente un 95 %, idéntico en al menos aproximadamente un 90 %, idéntico en al menos aproximadamente un 85 %, idéntico en al menos aproximadamente un 80 %, o idéntico en al menos aproximadamente un 75 % a cualquiera de las SEQ ID NO: 151-162. En otra realización, el aptámero para la cadena de toxina B binaria incluye una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 151-162 o fragmentos de cualquiera de las mismas.

El aptámero para una toxina producida por *C. difficile* puede contener cualquier número de nucleótidos además de la región que se une a la toxina de *C. difficile*. En diversas realizaciones, el aptámero puede incluir hasta aproximadamente 100 nucleótidos, hasta aproximadamente 95 nucleótidos, hasta aproximadamente 90 nucleótidos, hasta aproximadamente 85 nucleótidos, hasta aproximadamente 80 nucleótidos, hasta aproximadamente 75 nucleótidos, hasta aproximadamente 70 nucleótidos, hasta aproximadamente 65 nucleótidos, hasta aproximadamente 60 nucleótidos, hasta aproximadamente 55 nucleótidos, hasta aproximadamente 50 nucleótidos, hasta aproximadamente 45 nucleótidos, hasta aproximadamente 40 nucleótidos, hasta aproximadamente 35 nucleótidos, hasta aproximadamente 30 nucleótidos, hasta aproximadamente 25 nucleótidos, y hasta aproximadamente 20 nucleótidos.

El aptámero para una toxina producida por *C. difficile* se puede seleccionar para que tenga cualquier constante de disociación (K_d) adecuada para la respectiva toxina. En una realización a modo de ejemplo, el aptámero para una toxina producida por *C. difficile* tiene una constante de disociación (K_d) para la respectiva toxina de aproximadamente 10 nM o inferior. En otra realización a modo de ejemplo, el aptámero para una toxina producida por *C. difficile* tiene una constante de disociación (K_d) para la respectiva toxina de aproximadamente 15 nM o inferior. Además, en otra realización a modo de ejemplo, el aptámero para una toxina producida por *C. difficile* tiene una constante de disociación (K_d) para la respectiva toxina de aproximadamente 20 nM o inferior. Además, en otra realización a modo de ejemplo, el aptámero para una toxina producida por *C. difficile* tiene una constante de disociación (K_d) para la respectiva toxina de aproximadamente 25 nM o inferior. Una constante de disociación adecuada se puede determinar con un ensayo de unión usando una valoración en múltiples puntos y ajustando la ecuación $y = (\text{máx} - \text{mín})(\text{Proteína}) / (K_d + \text{Proteína}) + \text{mín}$. Se debe observar que la determinación de las constantes de disociación es altamente dependiente de las condiciones en las que se miden y por lo tanto estos números pueden variar de forma significativa con respecto a factores tales como el tiempo de equilibrio, etc. En otras realizaciones, el aptámero para una toxina producida por *C. difficile* es un aptámero con una K_d que es inferior o igual a la K_d de un aptámero seleccionado entre las secuencias que se desvelan en las Tablas 4, 6, 8 y 10.

Dado que la toxina binaria está formada por una cadena A y una cadena B, la unión más eficaz se puede conseguir usando una forma dimerica u otra forma multimérica del aptámero. Por lo tanto, en otra realización, el aptámero es una multimerización de cualquier combinación de las secuencias de la Tabla 8 y las secuencias de la Tabla 10. Las mismas estrategias se podrían aplicar a cualquier secuencia de aptámeros con las características de unión apropiadas para la toxina binaria. En otra realización, se podría usar un aptámero para la cadena A en conjunto con un aptámero para la cadena B para detectar toxina binaria en un ensayo de sándwich.

Kits Que Comprenden Aptámeros para Toxinas Producidas por *C. difficile*

La presente divulgación proporciona kits que comprenden cualquiera de los aptámeros para toxinas producidas por *C. difficile* descritas en el presente documento. Tales kits pueden comprender, por ejemplo, (1) al menos un aptámero para una toxina producida por *C. difficile*; y (2) al menos un reactivo de ensayo de diagnóstico, tal como un disolvente o solución. Los componentes adicionales del kit pueden incluir opcionalmente, por ejemplo: (1) al menos un envase, vial o aparato similar para alojar y/o mezclar los componentes del kit; y (2) aparato para recoger una muestra a someter a ensayo para la presencia de una toxina de *C. difficile*.

10 Métodos para Detectar Toxinas Producidas por *C. difficile*

La presente divulgación proporciona métodos para detectar la presencia de una toxina de *C. difficile* en una muestra de ensayo que comprende poner en contacto dicha muestra de ensayo con un aptámero que se une a una toxina producida por *C. difficile* en el que dicha toxina se selecciona entre toxina A, toxina B, cadena de toxina A binaria, y cadena de toxina B binaria. Además, se desvelan métodos para detectar la presencia de una toxina de *C. difficile* que comprenden aptámeros que comprenden al menos una pirimidina modificada en una posición C-5 en los que dicha al menos una pirimidina modificada en una posición C-5 comprende una modificación en la posición C-5 independientemente elegidos entre al menos una de las modificaciones mostradas en la Figura 9. También se desvelan métodos para detectar la presencia de una toxina de *C. difficile* que comprende aptámeros que comprenden al menos una pirimidina modificada en una posición C-5 en los que dicha al menos una pirimidina modificada en una posición C-5 comprende una modificación en la posición C-5 se elige independientemente entre bencilcarboxiamida, naftilmetilcarboxiamida, triptaminocarboxiamida, tirosilcarboxiamida, 2-naftilmetilcarboxiamida y fenetil-1-carboxiamida. Los métodos para detectar una toxina de *C. difficile* desvelados en el presente documento pueden comprender un aptámero que comprende al menos una modificación química adicional, en los que dicha al menos una modificación química adicional es una sustitución química en una o más posiciones seleccionadas independientemente entre el grupo que consiste en una posición de ribosa, una posición de desoxirribosa, una posición de fosfato, y una posición de base. Además, los métodos para detectar una toxina de *C. difficile* desvelados en el presente documento pueden comprender al menos una modificación química adicional se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en una modificación de azúcar en la posición 2', una modificación en la posición 2'-amino (2'-NH₂), en la posición 2'-fluoro (2'-F), en la posición 2'-O-metilo (2'-OMe) en una amina exocíclica de citosina, una sustitución de 5-bromouracilo, una sustitución de 5-bromodesoxiuridina, una sustitución de 5-bromodesoxicitidina, una modificación de estructura principal, metilación, una protección en la posición 3', y una protección en la posición 5'.

La presente divulgación proporciona métodos para detectar la presencia de una toxina de *C. difficile* en una muestra de ensayo en la que el método de detección se selecciona entre un ensayo de captación, ensayo de transferencia puntual, ensayo de PCR o ensayo de sándwich.

La presente divulgación también proporciona métodos para detectar la presencia de la toxina A de *C. difficile* en una muestra de ensayo que comprende poner en contacto dicha muestra de ensayo con un aptámero que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-4, 6-10, 12-14, 16-22, 24-27, o 29-31 o un fragmento de las mismas. Los métodos para detectar la presencia de la toxina A de *C. difficile* en una muestra de ensayo pueden comprender un ensayo de captación, ensayo de transferencia puntual, ensayo de PCR o ensayo de sándwich. Los ensayos de sándwich usados para detectar la presencia de la toxina A de *C. difficile* se pueden seleccionar entre un ensayo de aptámero-diana-anticuerpo, ensayo de anticuerpo-diana-aptámero, y ensayo de aptámero-diana-aptámero. Los métodos para detectar la presencia de la toxina A de *C. difficile* en una muestra de ensayo pueden proporcionar una medida cuantitativa de la toxina A.

La presente divulgación también proporciona métodos para detectar la presencia de la toxina B de *C. difficile* en una muestra de ensayo que comprende poner en contacto dicha muestra de ensayo con un aptámero que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 33-46, 48-65, 67-74, 76-82, 84-89, 91-94, 96-97, o 99-108 o un fragmento de las mismas. Los métodos para detectar la presencia de la toxina B de *C. difficile* en una muestra de ensayo pueden comprender un ensayo de captación, ensayo de transferencia puntual, ensayo de PCR o ensayo de sándwich. Los ensayos de sándwich usados para detectar la presencia de la toxina B de *C. difficile* se pueden seleccionar entre un ensayo de aptámero-diana-anticuerpo, ensayo de anticuerpo-diana-aptámero, y ensayo de aptámero-diana-aptámero. Los métodos para detectar la presencia de la toxina B de *C. difficile* en una muestra de ensayo pueden proporcionar una medida cuantitativa de la toxina B.

La presente divulgación también proporciona métodos para detectar la presencia de la cadena de toxina A binaria de *C. difficile* en una muestra de ensayo que comprende poner en contacto dicha muestra de ensayo con un aptámero que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 109, 111-123, 126-133, 135-138, 140-144, o 146-150 o un fragmento de las mismas. Los métodos para detectar la presencia de la cadena de toxina A binaria de *C. difficile* en una muestra de ensayo pueden comprender un ensayo de captación, ensayo de transferencia puntual, ensayo de PCR o ensayo de sándwich. Los ensayos de sándwich usados para detectar la presencia de la cadena de toxina A binaria de *C. difficile* se pueden seleccionar entre un ensayo de aptámero-diana-anticuerpo, ensayo de anticuerpo-diana-aptámero, y ensayo de aptámero-diana-aptámero. Los métodos para

detectar la presencia de la cadena de toxina A binaria de *C. difficile* en una muestra de ensayo pueden proporcionar una medida cuantitativa de la cadena de toxina A binaria.

5 La presente divulgación también proporciona métodos para detectar la presencia de la cadena de toxina B binaria de *C. difficile* en una muestra de ensayo que comprende poner en contacto dicha muestra de ensayo con un aptámero que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 153-156, 158-162 o un fragmento de las mismas. Los métodos para detectar la presencia de la cadena de toxina B binaria de *C. difficile* en una muestra de ensayo pueden comprender un ensayo de captación, ensayo de transferencia puntual, ensayo de PCR o ensayo de sándwich. Los ensayos de sándwich usados para detectar la presencia de la cadena de toxina B binaria de *C. difficile* se pueden seleccionar entre un ensayo de aptámero-diana-anticuerpo, ensayo de anticuerpo-diana-aptámero, y ensayo de aptámero-diana-aptámero. Los métodos para detectar la presencia de la cadena de toxina B binaria de *C. difficile* en una muestra de ensayo pueden proporcionar una medida cuantitativa de la cadena de toxina B binaria.

15 La presente divulgación también proporciona métodos para detectar la presencia de una toxina de *C. difficile* en una muestra de ensayo que comprende poner en contacto dicha muestra de ensayo con un aptámero que comprende una secuencia consenso seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 11, 15, 23, 28, 32, 47, 66, 75, 83, 90, 95, 98, 110, 124-125, 134, 139, 145, 151-152 y 157 o un fragmento de las mismas. Los métodos para detectar la presencia de una toxina de *C. difficile* con un aptámero que comprende tal secuencia consenso en una muestra de ensayo pueden comprender un ensayo de captación, ensayo de transferencia puntual, ensayo de PCR o ensayo de sándwich. Los ensayos de sándwich usados para detectar la presencia de una toxina de *C. difficile* se pueden seleccionar entre un ensayo de aptámero-diana-anticuerpo, ensayo de anticuerpo-diana-aptámero, y ensayo de aptámero-diana-aptámero. Los métodos para detectar la presencia de una toxina de *C. difficile* en una muestra de ensayo pueden proporcionar una medida cuantitativa de tal toxina de *C. difficile*.

25

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas. Todos los ejemplos descritos en el presente documento se deberían considerar en el contexto de las técnicas convencionales, que son bien conocidas y de rutina para los expertos en la materia. Se pueden realizar técnicas de biología molecular de rutina m como se describe en manuales de laboratorio convencionales, tales como Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (2001).

35 Ejemplo 1. SELEX con Toxinas A/B y Toxina Binaria de *C. difficile*: Obtención de Diana

Obtención de Diana

40 Las dianas adecuadas para SELEX se prepararon mediante amplificación con PCR de los fragmentos de genes deseados a partir de ADN genómico de *C. difficile*, clonación el marco en el vector pET-51b entre las secuencias de la etiqueta de Estrep y de la etiqueta de His, y sobreexpresión en Rosetta de *E. coli* (Tabla 1). Para la toxina A, se obtuvo un polipéptido recombinante que consistía en las repeticiones 17-32 de la horquilla β carboxi-terminal. Este dominio de toxina se eligió ya que se había publicado una estructura cristalina para un péptido de toxina A similar sólo con cinco repeticiones de unión a receptor (Ho, J.G., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005. 102 (51): p. 18373-8). Para la toxina B, el dominio catalítico amino-terminal se purificó; se obtuvo una estructura cristalina de este dominio (Reinert, D.J., *et al.*, J. Mol. Biol., 2005. 351 (5): p. 973-81). Para la toxina binaria, la subunidad CdtA de longitud completa pero sin la secuencia señal predicha se produjo en forma recombinante (estructura cristalina disponible (Sundriyal, A., *et al.*, J. Biol. Chem., 2009. 284 (42): p. 28713-9)), y se produjo un fragmento de CdtB (restos 30-207 del aminoácido) que representa el denominado dominio de activación que supuestamente se ha retirado por escisión de la proteína precursora de CdtB (Perelle, S., *et al.*, Infect. Immun., 1997. 65 (4): p. 1402-7). La clonación y la purificación de todas las toxinas de *C. difficile* se muestra en la Figura 1A-1D, junto con estructuras cristalinas disponibles. Las proteínas con doble etiqueta, recombinantes se purificaron mediante cromatografía por afinidad sobre Ni-NTA agarosa y estreptactina agarosa usando protocolos convencionales.

55 **Tabla 1.** Amplificación con PCR de genes de toxina de *C. difficile* para clonación y sobreexpresión

Amplificación con PCR			Proteína diana		
Gen	Cebadores de PCR	Amplicón (nucleótidos)	Proteína (UniProt)	Dominio (restos)	Tamaño (kDa) (etiquetado)
<i>tcdA</i>	<i>tcdA</i> -6 +	6751-8127	Toxina A (TOXA	2250-2709	57,1
	<i>tcdA</i> -2		CLODI)		
<i>tcdB</i>	<i>tcdB</i> -5 +	1-1638	Toxina B	1-546	68,8

	<i>tcdB-7</i>		(TOXB CLODI)		
<i>cdtA</i>	<i>cdtA-1 +</i>	103-1387	Toxina A Binaria	35-463	54,7
	<i>cdtA-2</i>		(O32738_CLODI)		
<i>cdtB</i>	<i>cdtB-15 +</i>	90-622	Toxina B Binaria	30-207	26,0
	<i>cdtB-16</i>		(O32739_CLODI)		
SEQ ID NO:	Cebador	Cebador de Secuencia (sitios de restricción para clonación subrayados)			
163	<i>tcdA-6</i>	GCGCAAGCTTCTTCAAATGGATATATTACTATTGAAAG			
164	<i>tcdA-2</i>	GCGCGAGCTCCATATATCCCAGGGGCTTTTAC			
165	<i>tcdB-5</i>	GCGCAAGCTTATGAGTTTAGTTAATAGAAAACAGTTAG			
166	<i>tcdB-7</i>	GCGCAAGCTTCATCTTCACCAAGAGAACCTTC			
167	<i>cdtA-1</i>	GCGCAAGCTTCAAGACTTACAAAGCTATAGTG			
168	<i>cdtA-2</i>	GCGCGAGCTCCAGGTATCAATGTTGCATCAAC			
169	<i>cdtB-15</i>	GCGCAAGCTTCAAAGTAGTACAAGTAATC			
170	<i>cdtB-16</i>	GCGCGAGCTCGGTCAAAGAAATTGTTATTTGGG			

Ejemplo 2. SELEX con Toxinas A/B y Toxina Binaria *C. difficile*: Afinidades de SELEX y Combinación

El SELEX con las proteínas etiquetadas con His purificadas se realizó usando reparto de Dynabeads® (Talon® o Etiqueta de His). Se usaron bibliotecas de secuencias aleatorias de 40meros que contenían uno de los seis nucleótidos modificados, 5-tirosilcarboxiamida-dU (TyrdU), 5-bencilcarboxiamida-dU (BndU), 5-naftilmetilcarboxiamida-dU (NapdU), 5-triptaminocarboxiamida-dU (TrpdU), 5-(2-naftilmetil)carboxiamida (2NapdU), o 5-fenetil-1-carboxiamida (PEdU) en lugar de dU. Se realizaron siete u ocho rondas de selección, y en las rondas 2-8 se aplicó una estimulación cinética con sulfato de dextrano. Las combinaciones de aptámero obtenidas después de la última ronda de SELEX se sometieron a ensayo para afinidad hacia sus dianas en ensayos de unión con filtro, y las K_d y las mesetas se determinaron (Tabla 2).

Las combinaciones de aptámero obtenidas después de la última ronda de SELEX se sometieron a ensayo para afinidad hacia sus dianas en ensayos de unión con filtro, y las K_d y las mesetas se determinaron (Tabla 2). Para la toxina A, la combinación de aptámero 4943 (TrpdU) presentaba buena afinidad con una $K_d = 2,42$ nM. Las combinaciones 4936 (TyrdU) y 4939 (NapdU) eran activas, con las K_d de 11,5 y 10,8 nM, respectivamente. Las combinaciones 5564 (2NapdU) y 5577 (2NapdU) también eran activas, con las K_d de 4,63 y 6,40 nM. Para la toxina A, la combinación de aptámero 5570 (PEdU) era la mejor, con una $K_d = 1,61$ nM.

Para la toxina B, las combinaciones de aptámeros de TyrdU, BndU, NapdU, TrpdU, 2NapdU y PEdU demostraban afinidades excelentes con las K_d en el intervalo de 0,11-1,11 nM.

La cadena de la toxina A binaria también se usó de forma satisfactoria en la selección de aptámeros de alta afinidad y proporcionó la combinación 4758 (TrpdU) con $K_d = 0,40$ nM; combinación 5567 (2NapdU) con $K_d = 0,19$ nM; y combinación 5574 (PEdU) con $K_d = 0,30$ nM. La cadena de la toxina B binaria se usó para seleccionar la combinación 5556 (2NapdU) activa, con $K_d = 7,58$ nM.

Todas las combinaciones con una afinidad suficiente (K_d de ~10 nM o inferior) se clonaron y se determinaron las secuencias de al menos 48 clones por combinación.

Tabla 2. SELEX con toxinas de *C. difficile*

Diana	Biblioteca	MOD	ID de la Muestra	Combinación	K_d (nM)	Meseta
Toxina A	40N29.14	TyrdU,	S247-R8-S1	4936	11,50	42 %
		BndU	S247-R8-S9	n/d ¹	70,30	40 %
		NapdU	S247-R8-S17	4939	10,80	48 %
		TrpdU	S247-R8-S25	4943	2,42	46 %

	40N32.24	2NapdU	S270-R8-S1	5564	4,63	42 %
		PEdU	S270-R8-S9	5570	1,61	21 %
		2NapdU	S270-R8-S29	5577	6,40	23 %
Toxina B	40N29.14	TyrdU,	S247-R8-S3	4937	0,57	43 %
		BndU	S247-R8-S11	4938	1,11	24 %
		NapdU	S247-R8-S19	4940	0,20	44 %
		TrpdU	S247-R8-S27	4944	0,24	43 %
	40N32.24	2NapdU	S270-R8-S5	5566	0,11	18 %
		PEdU	S270-R8-S13	5573	0,12	50 %
		2NapdU	S270-R8-S30	5578	0,79	16 %
Cadena de Toxina A Binaria	40N58.50	TrpdU	S239-R7-S39	4758	0,40	50 %
	40N32.24	2NapdU	S261-R8-S24	5551	0,22	36 %
		PEdU	S261-R8-S32	5555	3,73	33 %
		2NapdU	S270-R8-S6	5567	0,19	45 %
		PEdU	S270-R8-S14	5574	0,30	65 %
		2NapdU	S270-R8-S31	5579	0,33	63 %
Cadena de Toxina B Binaria	40N32.24	2NapdU	S261-R8-S33	5556	7,58	32 %
¹ combinación no clonada debido a afinidad insuficiente						

Ejemplo 3. Clones de Aptámero de Toxina A

- 5 Los clones representativos de las combinaciones 4936 (TyrdU), 4939 (NapdU), 4943 (TrpdU), 5564 (2NapdU), 5577 (2NapdU), y 5570 (PEdU) de SELEX se evaluaron para afinidad hacia la toxina A en ensayos de unión en filtro. Casi todos los clones presentaban buena afinidad hacia el fragmento de la toxina A recombinante de 57,1 kDa que se había usado para selección, sin embargo, solamente algunos de los clones demostraban afinidad hacia la toxina A de 308 kDa, nativa. Esto no es sorprendente, ya que algunos de los epítomos en la proteína recombinante, más pequeña pueden no ser accesibles para la unión a aptámero de la toxina nativa, de longitud completa.

Las afinidades (K_d) y las mesetas de las curvas de unión se muestran en la Tabla 3 y las secuencias correspondientes se enumeran en la Tabla 4, con los mejores clones mostrados en negrita.

- 15 Clones de la Combinación 4936 (TyrdU): el clon 4936-4 representaba un 20 % de las secuencias en la combinación y era el más activo con $K_d = 3,8$ nM para el dominio de la toxina A recombinante y $K_d = 14,5$ nM para la toxina A nativa.

- 20 Clones de la Combinación 4939 (NapdU): se encontraron tres secuencias no relacionadas cinco veces cada una en esta combinación. El clon 4939-280 era el clon más activo en esta combinación, con $K_d = 2,34$ nM para la proteína recombinante y $K_d = 15,3$ nM para la toxina A nativa.

- 25 Clones de la Combinación 4943 (TrpdU): en esta combinación se encontraron cuatro clones con buena afinidad (nanomolar baja) para la toxina A nativa. El mejor clon, 4943-51 ($K_d = 1,78$ nM para la toxina A nativa), representaba un 19 % de todas las secuencias en esta combinación. Los otros tres clones presentaban el motivo común NNANAnnCnNNCnncnN (N = TrpdU; n = A, G, C, o TrpdU). Los clones 4943-50, 4943-60, y 4943-49 que poseían solamente 32 nucleótidos en lugar de los 40 habituales dentro de la región aleatoria (las K_d , 5,60 nM, 4,57 nM, y 7,91 nM para la toxina A nativa respectivamente) presentaban buena afinidad.

- 30 Clones de la Combinación 5564 (2NapdU): El clon más activo de esta combinación era 5564-49 ($K_d = 1,78$ nM para la toxina A nativa). Varios otros clones también estarán presentes en esta combinación, compartiendo uno de los tres patrones de secuencias NAAAGNAGGN, GNNRNCMKNCNGA (SEQ ID NO: 15), o CGGGNCGNGACAGANCGCA, respectivamente (N = 2NapdU; R = A o G; M = A o C; K = G o N).

35

Clones de la Combinación 5570 (PEdU): El clon líder, 5570-54, con $K_d = 0,12$ nM para la toxina A recombinante y $K_d = 6,91$ nM para la toxina A nativa, era la secuencia más abundante en esta combinación.

5 Clones de la Combinación 5577 (2NapdU): los clones activos compartían todo o parte del patrón NACCGAACGNNnNCAG-NCNGA (N = 2NapdU; n = A, G, C o 2NapdU). Estas secuencias se habían seleccionado en un SELEX especial, en el que una aptámero de la toxina A de competición (4943-51) estaba presente en un exceso de dos veces con respecto a la concentración de la proteína diana.

Tabla 3. Afinidades de Clones de Aptámero de SELEX con toxina A de *C. difficile*.

Aptámero de Toxina A (TOXA_CLODI)			Afinidad hacia proteína recombinante (Diana de SELEX)		Afinidad hacia proteína madura (diana nativa)	
ID de Clon	ID de Aptámero	MOD	K_d (nM)	Meseta	K_d (nM)	Meseta
247-8-1-1	4936-1_0	TyrdU	17,0	33 %		
247-8-1-3	4936-3_0	TyrdU	23,9	27 %		
247-8-1-4	4936-4_0	TyrdU	3,80	37 %	14,5	29 %
247-8-1-9	4936-9_0	TyrdU	33,3	11 %		
247-8-1-13	4936-13_0	TyrdU	25,7	45 %		
247-8-1-18	4936-18_0	TyrdU	74,5	36 %		
247-8-1-32	4936-32_0	TyrdU	19,9	40 %		
247-8-17-195	4939-195_0	NapdU	23,3	9 %	> 100	2 %
247-8-17-196	4939-196_0	NapdU	8,63	34 %	61,6	37 %
247-8-17-194	4939-194_0	NapdU	20,5	8 %		
247-8-17-280	4939-280_0	NapdU	2,34	28 %	15,3	30 %
247-8-17-281	4939-281_0	NapdU	1,35	24 %	>100	0 %
247-8-17-209	4939-209_0	NapdU	11,4	27 %	202	55 %
247-8-17-202	4939-202_0	NapdU	13,2	34 %	104	50 %
247-8-17-246	4939-246_0	NapdU	12,5	34 %	58,4	31 %
247-8-25-49	4943-49_0	TrpdU	1,39	49 %	7,91	43 %
247-8-25-50	4943-50_0	TrpdU	2,81	36 %	5,60	54 %
247-8-25-51	4943-51_0	TrpdU	1,23	43 %	1,78	54 %
247-8-25-60	4943-60_0	TrpdU	2,65	46 %	4,57	46 %
247-8-25-71	4943-71_0	TrpdU	6,26	18 %		
247-8-25-73	4943-73_0	TrpdU	0,82	13 %		
247-8-25-91	4943-91_0	TrpdU	0,43	10 %		
270-8-1-49	5564-49_0	2NapdU	1,13	30 %	1,78	11 %
270-8-1-50	5564-50_0	2NapdU	6,99	31 %	>100	0 %
270-8-1-52	5564-52_0	2NapdU	1,86	41 %	19,30	20 %
270-8-1-58	5564-58_0	2NapdU	6,29	43 %	46,00	25 %
270-8-1-65	5564-65_0	2NapdU	2,80	20 %	>100	1 %
270-8-1-84	5564-84_0	2NapdU	2,87	46 %	>100	1 %
270-8-1-89	5564-89_0	2NapdU	3,40	34 %	11,90	17 %
270-8-1-66	5564-66_0	2NapdU	7,17	41 %	>100	2 %
270-8-1-161	5564-161_0	2NapdU	2,71	67 %	6,15	12 %

ES 2 629 183 T3

270-8-9-50	5570-50_0	PEdU	4,87	23 %	>100	0 %
270-8-9-54	5570-54_0	PEdU	0,12	24 %	6,91	8 %
270-8-29-1	5577-1_0	2NapdU	1,59	48 %	4,97	21 %
270-8-29-3	5577-3_0	2NapdU	1,73	39 %	5,52	22 %
270-8-29-12	5577-12_0	2NapdU	6,48	53 %	12,90	19 %

Tabla 4. Clones de Aptámero de Toxina A de C. difficile. Las secuencias líder tienen su "ID de Aptámero N.º" en negrita y las secuencias consenso están subrayadas y aparecen bajo la etiqueta "Patrón de la Secuencia". La base con "N" mayúscula representa el nucleótido modificado como se indica para la combinación en particular (TyrDU, NapDU, TrpDU, 2NapDU, o PEdU). La base de "n" en letra minúscula en la secuencia consenso indica una base variable dentro de un motivo que se selecciona entre A, G, C o el nucleótido modificado para la combinación en particular (TyrDU, NapDU, TrpDU, 2NapDU, o PEdU). Se usaron los códigos de ambigüedad de nucleótidos de la IUPAC: M = A o C; R = A o G; K = G o N (con N representando el dU modificado específico de la combinación), y para definir el consenso se usó un punto de corte de un 90 % de la representación.

Clones de Combinación 4936 (TyrDU)			
SEQ ID NO.	N.º de ID del Aptámero	Recuento	Pct
1	4936-4	8	20 %
			AANNCCNANCCNANNANCACACNNNCNAGANNANNCNANG
Clones de Combinación 4939 (NapDU)			
SEQ ID NO.	N.º de ID del Aptámero	Recuento	Pct
2	4939-196	5	3 %
			GNCANNNGCCCCACGNCANINANCNGACNNCGACNAACGA
3	4939-280	5	3 %
			ACNNGNAGNAGCCCCNNAANNNGGGNNGCGNCGGCANNANGG
4	4939-246	5	3 %
			CNCGNNAGGGNNNANCCAAANACCNGGGGNCNNNAACNAAA
Clones de Combinación 4943 (TrpDU)			
SEQ ID NO.	N.º de ID del Aptámero	Recuento	Pct
6	4943-50	6	7 %
			AGCANINAAANNANAGACNNINCGNANCNGNCCCNCNCGGN
7	4943-60	6	7 %
			ANCNINCACANINANAGACNNINCNANGGNCNCCNGAGAG
8	4943-49	4	5 %
			NGCCNAAACCNANAAACNNINCCACGNGNACNIN
9	4943-51	15	19 %
			GNNANCAACNCGNANGGNCAGCGNAAANNCNAGCNINAGA
Clones de Combinación 5564 (2NapDU)			
SEQ ID NO.	N.º de ID del Aptámero	Recuento	Pct
10	5564-49	6	7 %
			CCNGACGGGGGAGGNNCCAAACNNACNNCCGNCACNANINGC
			Patrón de Secuencia _NAAAGNAGGN
12	5564-52	15	17 %
			CGCANGNNGNINCGANACACNNGGCCNAAAGNAGGNCNAG
13	5564-57	1	1 %
			CCGNINCAANACCAANGGANAAGNAGGAGGAGGCGCA
14	5564-82	1	1 %
			NACCAGANAGNINANAACGCGNCCNAAAGNAGGACNAA
			Patrón de Secuencia GNNRNCMKNCNGA
16	5564-89	2	2 %
			CNAAANGAAGNINCGNAGNAGCGCCAGNCGGACCCGN
17	5564-54	1	1 %
			NGCGNACCCGCGNINGNINCGNAGGAGGAGGAGGCGCA

Ejemplo 4. Clones de Aptámero de Toxina B

- Las afinidades de los aptámeros para la toxina B generalmente eran muy buenas y se correlacionaban bien entre el dominio catalítico amino-terminal de 68,8 kDa del fragmento de la toxina B de *C. difficile* que se habían usado en SELEX y la toxina B de longitud completa, nativa de 270 kDa. Los clones de aptámero clones con K_d sub-nanomolares para la toxina B se aislaron de todas las combinaciones con nucleótidos modificados con TyrDU, BndU, NapdU, TrpdU, 2NapdU y PEdU (Tabla 5); las secuencias de aptámeros de toxina B de *C. difficile* se enumeran en en la Tabla 6, con los mejores clones mostrados en negrita.
- Clones de la Combinación 4937 (TyrDU): los alineamientos de los aptámeros de TyrDU indicaban la presencia de los patrones de secuencias distintos (YNNSSNGAAW (SEQ ID NO: 32), YGAAWN (SEQ ID NO: 47)), (N = TyrDU; W = A o N; S = C o G; Y = C o N), así como una secuencia huérfana.
- Clones de la Combinación 4938 (BndU): esta combinación contenía tres secuencias no relacionadas, todas estaban presentes en múltiples copias.
- Clones de la Combinación 4940 (NapdU): las secuencias más abundantes, incluyendo cuatro de los clones líder, contenían todo o parte del patrón KSGANNNGRW (SEQ ID NO: 66) (N = NapdU; R = A o G; W = A o N; S = C o G; K = G o N). Además, estaban presentes tres secuencias huérfanas no relacionadas.
- Clones de la Combinación 4944 (TrpdU): la mayoría de las secuencias contenían el patrón NnCYnnnNCNNnAARWNMAMSYN (SEQ ID NO: 75); otras dos secuencias compartían un patrón diferente, CNnGnANCNGGAAAN, (N = TrpdU; n = A, G, C o TrpdU; M = A o C; R = A o G; W = A o N; S = C o G; Y = C o N), y también estaban presentes cuatro secuencias huérfanas.
- Clones de la Combinación 5566 (2NapdU): Patrón
- En un par de clones se encontró AnCnNNNAAGNGAACNNnAnnnnnnnnGnGNNnANA (N = 2NapdU; n = A, G, C o 2NapdU). Esta combinación contenía dos secuencias no relacionadas adicionales en múltiples copias.
- Clones de la Combinación 5573 (PEdU): se identificaron dos patrones, GCCNNNCNNGNNAACGNCNNGANGGCAGCGNN y AGNNNGANCCC (N = PEdU). Estaban presentes seis clones no relacionados, adicionales.
- Clones de la Combinación 5578 (NapdU): dos clones activos estaban presentes en múltiples copias. Estas secuencias se habían seleccionado en un SELEX especial, en el que un aptámero de toxina B (4940-23) de competición estará presente en un exceso de dos veces con respecto a la concentración de la proteína diana.
- Los aptámeros de la afinidad más elevada aptámeros eran clones con nucleótidos modificados con NapdU o TrpdU. Cinco aptámeros demostraron K_d muy bajas < 0,1 nM para la toxina B nativa.

Tabla 5. Afinidades de Clones de Aptámero de SELEX con toxina B de *C. difficile*.

Aptámero de Toxina B (TOXB_CLODI)			Afinidad hacia proteína recombinante (Diana de SELEX)		Afinidad hacia proteína madura (diana nativa)	
ID de Clon	ID de Aptámero	MOD	K_d (nM)	Meseta	K_d (nM)	Meseta
247-8-3-49	4937-49_0	TyrDU	0,19	23 %	0,16	6 %
247-8-3-50	4937-50_0	TyrDU	0,36	26 %	0,27	4 %
247-8-3-51	4937-51_0	TyrDU	0,60	31 %	1,07	14 %
247-8-3-55	4937-55_0	TyrDU	0,15	39 %	0,15	15 %
247-8-3-57	4937-57_0	TyrDU	0,15	35 %	0,12	11 %
247-8-3-66	4937-66_0	TyrDU	0,63	34 %	0,59	14 %
247-8-3-67	4937-67_0	TyrDU	0,11	21 %	0,23	16 %
247-8-3-81	4937-81_0	TyrDU	0,23	19 %	0,28	13 %
247-8-3-85	4937-85_0	TyrDU	0,27	32 %	0,72	25 %
247-8-3-94	4937-94_0	TyrDU	0,27	27 %	0,36	12 %
247-8-11-1	4938-1_0	BndU	0,84	23 %	2,03	20 %

247-8-11-6	4938-6_0	BndU	1,02	16 %	1,52	17 %
247-8-11-17	4938-17_0	BndU	0,36	32 %	0,50	16 %
247-8-19-1	4940-1_0	NapdU	0,04	24 %	0,06	14 %
247-8-19-3	4940-3_0	NapdU	1,04	27 %	0,67	12 %
247-8-19-6	4940-6_0	NapdU	0,05	15 %	0,43	7 %
247-8-19-8	4940-8_0	NapdU	0,19	33 %	0,27	10 %
247-8-19-19	4940-19_0	NapdU	0,11	23 %	0,14	8 %
247-8-19-23	4940-23_0	NapdU	0,07	37 %	0,09	13 %
247-8-19-27	4940-27_0	NapdU	0,10	34 %	0,09	12 %
247-8-27-1	4944-1_0	TrpdU	0,20	26 %	0,13	10 %
247-8-27-4	4944-4_0	TrpdU	0,10	29 %	0,16	11 %
247-8-27-5	4944-5_0	TrpdU	0,08	33 %	0,09	10 %
247-8-27-9	4944-9_0	TrpdU	0,18	36 %	0,14	9 %
247-8-27-11	4944-11_0	TrpdU	0,14	24 %	0,22	6 %
247-8-27-14	4944-14_0	TrpdU	0,24	20 %	0,70	9 %
247-8-27-20	4944-20_0	TrpdU	0,12	25 %	0,18	7 %
247-8-27-30	4944-30_0	TrpdU	0,06	28 %	0,08	9 %
247-8-27-34	4944-34_0	TrpdU	0,07	35 %	0,41	10 %
270-8-5-53	5566-53_0	2Napd	0,02	5 %	0,22	15 %
270-8-5-74	5566-74_0	2Napd	0,04	6 %	0,25	21 %
270-8-5-77	5566-77_0	2Napd	NT	NT	0,23	6 %
270-8-13-2	5573-2_0	PEdU	0,03	33 %	0,11	15 %
270-8-13-3	5573-3_0	PEdU	0,04	52 %	0,25	12 %
270-8-13-4	5573-4_0	PEdU	0,03	54 %	0,08	12 %
270-8-13-5	5573-5_0	PEdU	0,06	49 %	0,55	14 %
270-8-13-9	5573-9_0	PEdU	0,01	45 %	0,14	13 %
270-8-13-11	5573-11_0	PEdU	6,82	36 %	2,70	8 %
270-8-13-14	5573-14_0	PEdU	0,04	21 %	0,33	9 %
270-8-13-23	5573-23_0	PEdU	1,49	35 %	0,55	9 %
270-8-13-24	5573-24_0	PEdU	0,02	33 %	0,11	10 %
270-8-30-66	5578-66_0	2Napd	0,98	14 %	NT	NT
270-8-30-73	5578-73_0	2Napd	1,62	18 %	NT	NT

Tabla 6. Clones de Aptámero de Toxina B de *C. difficile*. Las secuencias líder tienen su "ID de Aptámero N.º" en negrita y las secuencias consenso están subrayadas y aparecen bajo la etiqueta "Patrón de la Secuencia". La base con "N" mayúscula representa el nucleótido modificado como se indica para la combinación en particular (TyrdU, BndU, NapdU, TrpdU, 2NapdU, o PEdU). La base de "n" en letra minúscula en la secuencia consenso indica una base variable dentro de un motivo que se selecciona entre A, G, C o el nucleótido modificado para la combinación en particular (TyrdU, NapdU, TrpdU, 2NapdU, o PEdU). Se usaron los códigos de ambigüedad de nucleótidos de la IUPAC: M = A o C; R = A o G; W = A o N; S = C o G; Y = C o N; K = G o N (con N representando el dU modificado específico de la combinación), y para definir el consenso se usó un punto de corte de un 90 % de la representación.

5

10

Clones de Combinación 4937 (TyrdU)				
SEQ ID NO.	N.º de ID del Aptámero	Recuento	Pct	Patrón de Secuencia
<u>YNNSSNGAAW</u>				
33	4937-50	6	8 %	NANNNCCNNAAGGCNNGGNGAAAACCGCNNNNCGGNNGCG
34	4937-51	3	4 %	NGGACCACNANCCCNCNCCCACNNNNNCGNGAACNNGAGNN
35	4937-53	2	3 %	NGGANACGNANNCCCACNNACCNNCCNGAAANAGCANNN
36	4937-54	4	5 %	ACNNGGNGAAANNACNNNCNGCCAGCANCNANNCCC GCN
37	4937-56	2	3 %	NNGGCACGAAGNANNGACNNNGAANNGCNGAAACANCNNNNCN
38	4937-57	5	6 %	NGGACACCNANNACAGNCNNCGNGAAANNGCANNN
39	4937-61	2	3 %	GNGCNGCCCANCNANCCNCNCNNANGAANCCGAANNCC
40	4937-63	2	3 %	NCCANNCCACCGCGGNGCCACAGNANCANGNNNGCNGAAN
41	4937-74	2	3 %	NCCNANCCNCNCNCCGNGAANCCGAANNGCCNACNGCCNN
42	4937-78	2	3 %	NCACAAACNANCCGNCCNNGGNGAANNCNCAANNNCNGGN
43	4937-81	4	5 %	NACNANCACGCNNNNGGNGAANNCGAANNCCC GGAGGNN
44	4937-86	1	1 %	AGGCGGGNCNNCANANCCCGCAANNGAANGCACGCNNNCC
45	4937-87	2	3 %	GNGACCAACNANGNNANCNNCGNGAANCCGAANNGCCGN
46	4937-94	4	5 %	CACACNANNCCCACCANGANNGGNGAAANAGCANNNCN
Patrón de Secuencia				
<u>YGAAWN</u>				
48	4937-85	1	1 %	CNNACNGAANACNNGAGCAACANCCCGCANNGCCGA
49	4937-61	2	3 %	GNGCNGCCCANCNANCCNCNCNNANGAANCCGAANNCC
50	4937-74	2	3 %	NCCNANCCNCNCNCCGNGAANCCGAANNGCCNACNGCCNN
51	4937-87	2	3 %	GNGACCAACNANGNNANCNNCGNGAANCCGAANNGCCGN
52	4937-55	12	16 %	AACCCNGNANNCCACACCNNGCCGAAANNGANNNCNNGN
53	4937-52	2	3 %	ACCANGNANNACCCNCCNNGCCGAAANAGANNNCNGG
54	4937-81	4	5 %	NACNANCACGCNNNNGGNGAANNCGAANNCCC GGAGGNN
55	4937-49	4	5 %	NCNANNCCCCGAGNCNNGANANCCACGANNGAANNN
56	4937-56	2	3 %	NNGGCACGAAGNANNGACNNNGAANNGCNGAAACANCNNNNCN
57	4937-78	2	3 %	NCACAAACNANCCGNCCNNGGNGAANNCNCAANNNCNGGN
58	4937-73	2	3 %	NCNAACCGGNCCGANNACANGAAANAGGAGGACANCG
59	4937-96	1	1 %	GAGCNAANNGAAGCNACAGGACNCNNGGCACGACGGGNN
60	4937-53	2	3 %	NGGANACGNANNCCCACNNACCNNCCNGAAANAGCANNN
61	4937-66	4	5 %	GGNCNCANCGACAAANNNGGAANGNGCGAGCACNANNCGN
62	4937-67	1	1 %	GGGCNAGNANCNGCAGAGCCAGNAGGAACNAGACGGNGN (huérfana)

Clones de la Combinación 4938 (BndU)				
SEQ ID NO.	N.º de ID del Aptámero	Recuento	Pct	
63	4938-1	5	10 %	NNGGCGCCGNNNGCGGNANGACNCCCNNNNCNNANGGCNG
64	4938-6	4	8 %	AGNGCNAGCGACNCCGCGGNACNACNNCNCNCCNACNAGN
65	4938-17	3	6 %	NANAAAGANCNNGCCNNGNAANNCCNCANGACANAANA
Clones de la Combinación 4940 (NapdU)				
SEQ ID NO.	N.º de ID del Aptámero	Recuento	Pct	Patrón de la Secuencia
				<u>KSGANNGGRW</u>
67	4940-1	9	20 %	NCCNNNGCGAANC GGGANNGGANNACGGNNGGGCAANAGN
68	4940-23	4	9 %	AGGCNCAANGGNGNANCGANNGGAAAGCAGNNAANCGAN
69	4940-19	2	5 %	GCGCNCAGNNGGNNGGANNGGGAGNNGGAANNAGGNAGCA
70	4940-31	1	2 %	NGGGNCNCAAGNNGGNNGGCCCANNGGGANNGGAAGNCCN
71	4940-6	2	5 %	CCNCGCGCNGANNNGCAANNAGCACGGCNGNCGGNGAACN
72	4940-3	1	2 %	NCCANCGGGACCACNAACGNNAGCNCCAGGCGGGACNGNC (huérfana)
73	4940-8	1	2 %	NANCAGACCNCCANCGCGNCACNNANGAGNNGAACACGA (huérfana)
74	4940-27	1	2 %	NANNNGNCCCANNCCCACNNAANGCNAGCACACGNNAAACA (huérfana)
Clones de la Combinación 4944 (TrpdU)				
SEQ ID NO.	N.º de ID del Aptámero	Recuento	Pct	Patrón de la Secuencia
				<u>NnCYnnnNCNNnAARWNMAMSYN</u>
76	4944-1	2	4 %	CANGNCNCAANCNNNAAGANAACGNNGACCGCGAGNACCG
77	4944-13	4	9 %	NGCNGACAGACACANGNCCCCNCNCNNAAGANAACGNNG
78	4944-40	1	2 %	ANCACCCNCNNAAGANAACGNNCCGGACCGCGCGANAA
79	4944-14	4	9 %	NCNGCNANGNCNNAAGANCAACCNAAGAGANGCANGANA
80	4944-23	1	2 %	GNNGGAGCGNNGNGGCNNCACNNACNGGANCNNGAACNC
81	4944-11	5	11 %	GNCGANCNCAAANNANGNACGANNGACCNAACANGGNAC
82	4944-34	10	22 %	NGGNNAGCACNNCANNANGGACCANANAACNCNAGNNAA
Patrón de la Secuencia				
				<u>CNnGnANCNGGAAAN</u>
83				
84	4944-17	2	4 %	ACNNNCGCACCCGGCCNNANGCCNNGCANNGGAAANGG
85	4944-4	1	2 %	NNNCGGAAGCCGCNNANCCGCCACNCGGANNGGAAAN
86	4944-5	1	2 %	NGNCGAGNAAACGGCGACCGNNNCCCNGNAGNAACNACA (huérfana)
87	4944-9	1	2 %	NGNNCAACNANGAANCCAGCNACCGNGCAACCAANGNA (huérfana)
88	4944-30	1	2 %	AGNGNAANAGNAACCCNAGACNANGCCNNGGGNANCGG (huérfana)

Patrón de la Secuencia				
89	4944-20	1	2 %	NGCGGCNGAAGAAGCANGCAAGNCANCGGNCNGNNGNAN (huérfana)
Clones de la Combinación 5566 (2NapdU)				
SEQ ID NO.	N.º de ID del Aptámero	Recuento	Pct	Patrón de la Secuencia
90				<u>AnCnNNNAAGNGAACNNNnAnnnnnnnnnGnGNNnANA</u>
91	5566-53	3	7 %	CCAGCANNNAAGNGAACNNNAAGGAAGGGAGGAGNNCANA
92	5566-90	1	2 %	AGACCGNNNAAGNGAACNNNCAACGGGANGCGNGNNAANA
93	5566-74	4	9 %	AGNGGCGNNAANGCANNNAACGAGCACNGAGGCGNNAANA
94	5566-77	3	7 %	CNNNNNACC GCNGCANGACNNNAGCGGCAGNCGNGNGNG
Clones de la Combinación 5573 (PEdU)				
SEQ ID NO.	N.º de ID del Aptámero	Recuento	Pct	Patrón de la Secuencia
95				GCCNNNCNNGNNAACGNCCNNGANGGCAGCGNN
96	5573-23	2	5 %	GAACGN GCCNNNCNNGNNAACGNCCNNGANGGCAGCGNN
97	5573-25	1	2 %	AACNCG GCCNNNCNNGNNAACGNCCNNGANGGCAGCGNN
Patrón de la Secuencia				
98				AGNNNGANCCC
99	5573-3	7	16 %	NACGGCANNCGNGGGCAAGNNGANCCCNCAGCCNAN
100	5573-5	2	5 %	CGANCACANCGCACANNAGNCAGNNGANCCANNAANCA
101	5573-2	14	32 %	NCAGGNANACCCAGNGNAGGAAAACGNGNACGNCCGAN
102	5573-4	8	18 %	AANNANGNGANCAANNAGCAGACCGCCANNNGACNNCG
103	5573-14	3	7 %	GGNGGNGGAAANNGGCAAGNGNANGGNGGNNACGCCGNAN
104	5573-24	2	5 %	NGCGNCNGANCCGNAAAACANNNCAAGCNACCANGNNNA
105	5573-9	2	5 %	CGCCGNNCCGNCCGCCACAANNAAGNACAANNNGAN
106	5573-11	2	5 %	NGNCCGCCGACCANNNNCNGNANAGCCNCNNGNAANNAGN
Clones de la Combinación 5578 (2NapdU)				
SEQ ID NO.	N.º de ID del Aptámero	Recuento	Pct	Patrón de la Secuencia
107	5578-66	3	7 %	GAAAGCNCGNACGNAGNNGAGAGGNCNCNGCCCNCNN
108	5578-73	4	9 %	ANNAAGCNNGGCGNGGAGCAGCCAGGGANNCCNGA

Ejemplo 5. Clones de Aptámero de Toxina Binaria (Cadena A)

5 El SELEX con la cadena de toxina A binaria (CdtA) recombinante proporcionó aptámeros activos con nucleótidos modificados con TrpdU, 2NapdU, y PEdU (Tabla 7).

Las secuencias y los patrones de secuencias comunes de CdtA aptámeros se muestran en la Tabla 8.

10 La clonación de la combinación 4758 (TrpdU) desveló el clon 4758-6 que comprendía un 18 % de las secuencias en esa combinación y presentaba buena afinidad ($K_d = 0,86$ nM) hacia la toxina binaria de CdtA.

ES 2 629 183 T3

Se obtuvieron veinte secuencias de las combinaciones de 2NapdU, la mayoría de ellas con afinidad subnanomolar, y se identificaron varios patrones de secuencias entre estos clones de 2NapdU: GAANANnNCCGNGAnGNAANGnnANANNS (SEQ ID NO: 110), ANNRGCNnCCNGGCS (SEQ ID NO: 124), WAWNNANNA (SEQ ID NO: 125), y GGANNGCAGGNMCMC (SEQ ID NO: 134) (N= PEdU; n= A, G, C o PEdU; M= A o C; W= A o N; S= C o G; R= A o G).

Las combinaciones de PEdU contenían cinco aptámeros activos; estaban presentes en múltiples copias, y tres de las secuencias compartían el patrón NAAAWGNNN (SEQ ID NO: 145) (N= PEdU; W= A o N).

10 **Tabla 7.** Afinidades de Clones de Aptámero de SELEX con cadena de toxina A binaria de *C. difficile*.

Aptámero de Cadena de Toxina A Binaria (CdtA_CLODI)			Afinidad hacia proteína CdtA recombinante (Diana de SELEX)	
ID del Clon	ID de Sec	MOD	K _d (nM)	Meseta
239-7-39-6	4758-6_0	TrpdU	0,86	18 %
261-8-24-49	5551-49_0	2NapdU	0,31	9 %
261-8-24-50	5551-50_0	2NapdU	0,09	30 %
261-8-24-52	5551-52_0	2NapdU	0,14	26 %
261-8-24-60	5551-60_0	2NapdU	5,79	60 %
261-8-24-81	5551-81_0	2NapdU	0,54	32 %
261-8-32-6	5555-6_0	PEdU	0,62	21 %
261-8-32-15	5555-15_0	PEdU	1,72	18 %
261-8-32-39	5555-39_0	PEdU	0,34	12 %
270-8-6-1	5567-1_0	2NapdU	0,15	24 %
270-8-6-2	5567-2_0	2NapdU	6,81	25 %
270-8-6-10	5567-10_0	2NapdU	0,03	17 %
270-8-6-13	5567-13_0	2NapdU	0,03	22 %
270-8-6-18	5567-18_0	2NapdU	0,16	10 %
270-8-6-34	5567-34_0	2NapdU	0,09	14 %
270-8-6-46	5567-46_0	2NapdU	0,05	12 %
270-8-14-49	5574-49_0	PEdU	0,16	57 %
270-8-14-56	5574-56_0	PEdU	2,92	55 %
270-8-31-5	5579-5_0	2NapdU	2,24	13 %
270-8-31-7	5579-7_0	2NapdU	2,44	44 %
270-8-31-8	5579-8_0	2NapdU	0,53	41 %
270-8-31-10	5579-10_0	2NapdU	0,15	36 %
270-8-31-11	5579-11_0	2NapdU	0,07	33 %
270-8-31-12	5579-12_0	2NapdU	0,97	53 %
270-8-31-21	5579-21_0	2NapdU	0,24	35 %

Tabla 8. Clones de Aptámero de Cadena de Toxina A Binaria de *C. difficile*. Las secuencias líder tienen su "ID de Aptámero N.º" en negrita y las secuencias consenso están subrayadas y aparecen bajo la etiqueta "Patrón de la Secuencia". La base con "N" mayúscula representa el nucleótido modificado como se indica para la combinación en particular (TrpdU, 2NdpdU, o PEdU). La base de "n" en letra minúscula en la secuencia consenso indica una base variable dentro de un motivo que se selecciona entre A, G, C o el nucleótido modificado para la combinación en particular (TrpdU, 2NdpdU, o PEdU). Se usaron los códigos de ambigüedad de nucleótidos de la IUPAC: M = A o C; R = A o G; W = A o U; S = C o G; (con N representando el dU modificado específico de la combinación), y para definir el consenso se usó un punto de corte de un 90 % de la representación.

Clones de Combinación 4758 (TrpdU)			
SEQ ID NO.	ID de Aptámero N.º	Recuento	Pct
109	4758-6	8	18 %
			GAAGACTTTAATTCTGACATGGTGTCCAATGGCCGGCGGAG
Clones de Combinaciones 5551, 5567, 5579 (2NdpdU)			
SEQ ID NO.	ID de Aptámero N.º	Recuento	Pct
111	5567-30	1	1 %
112	5579-21	5	4 %
113	5579-28	1	1 %
114	5567-1	11	9 %
115	5567-41		1 %
116	5551-77	1	1 %
117	5551-60	2	2 %
118	5579-48	1	1 %
119	5567-2	4	3 %
120	5567-26	1	1 %
121	5551-81	4	3 %
122	5579-7	7	6 %
123	5579-12	4	9 %
126	5579-11	10	11 %
127	5551-64	1	1 %
128	5551-78	1	1 %

Patrón de la Secuencia

GAANANINCCGNGAnGNAANGnnANANINS
 GAANCNGCCGNGACGNAANG AANANNC
 GAANCNGCCGNGACGNAANGCCANANNCGGAGGG
 GAN
 GAANCNGCCGNGAAGNAANGCCANANNCGcANG
 GAANANGNCCGNGAAGNAANGCGGANANNC
 GAANANGNCCGNGAAGNAANGCCANANNCgNCCAC
 GNGGG
 CCGGNcACCGCANNCNCCGNGACGNAANGACANANNCgGN
 AACCCCGGGCAANANNCNCCGNGAAGNAANG AANANNCcGA
 ACAGAGGCANNCNCCGNGANGNAANGCAANANNCcCGCCGN
 NGCAACNANCCGNGANGNAANGCAANANNCcAACANG
 NGC
 GGACNACNCCGNGANGNAANGCGAAANINCCcAGANG
 NA
 NCGAANGANAACANGNAACNCCGNGANINACNCGAANAAGN
 CNAAGCNCcGAGGCNINACNCCGNGANGcGANGNINAAACC
 NCGAGCAAGGAGNAACNCCGNGANINACAANCGANAGANGA

Patrón de la Secuencia

ANNRGCN CCNGGCS WAWNNANINA
 NINGNACCCcAANNAGCN CCNGGCGG GNNAAANINANNAGACA
 CANCCcAANNAGCNCCcNGGCGA NGNAANNANINANGGCAcN
 NCGNANACCCcGAANINAGCNCCcNGGCGA CCNAAANNANNAcA

(continuación)

Clones de Combinaciones 5555, 5574 (PEdU)			
SEQ ID NO.	ID de Aptámero N.º	Recuento	Pct
148	5574-49	13	20 %
			NANAANANGGN
149	5555-39	3	5 %
			AGCCGGNGNGNGNANNAACNCNINCGGCNINCCNCCCGCA
150	5574-56	11	17 %
			CNINGNAAACCGNGCGNINAGNANINGGAGANAGCNGACAN
			NNINCGAANAANAANGNNGANACANNACN

Ejemplo 6. Clones de Aptámero de Toxina Binaria (Cadena B)

El SELEX con cadena de toxina B binaria (CdtB) recombinante proporcionó aptámeros activos con nucleótidos modificados con 2NapdU (Tabla 9). Las secuencias y los patrones de secuencias comunes de aptámeros de CdtB se muestran en la Tabla 10. El clon más activo, 5556-51, contenía todos estos patrones, NNARASCS (SEQ ID NO: 151), NNNGGCNNNACG (SEQ ID NO: 152), y AGCCNNNGRCNN (SEQ ID NO: 157) (N = 2NapdU; R = A o G; S = C o G), algunos de los cuales estaban presentes en otras secuencias. Tres clones adicionales presentaban secuencias no relacionadas.

10 **Tabla 9.** Afinidades de Clones de Aptámero de SELEX con cadena de toxina B binaria de *C. difficile*.

Aptámero de Cadena de Toxina B Binaria (CdtA_CLODI)			Afinidad hacia proteína CdtB recombinante (Diana de SELEX	
ID del Clon	ID de Sec	MOD	K _d (nM)	Meseta
261-8-33-51	5556-51_0	2NapdU	1,68	38 %
261-8-33-57	5556-57_0	2NapdU	11,60	37 %
261-8-33-60	5556-60_0	2NapdU	12,30	48 %
261-8-33-67	5556-67_0	2NapdU	2,16	45 %
261-8-33-83	5556-83_0	2NapdU	7,62	33 %

Tabla 10. Clones de Aptámero de Cadena de Toxina B Binaria de *C. difficile*. Las secuencias líder tienen su "ID de Aptámero N.^o" en negrita y las secuencias consenso están subrayadas y aparecen bajo la etiqueta "Patrón de la Secuencia". La base con "N" mayúscula representa 2NapdU. Se usaron los códigos de ambigüedad de nucleótidos de la IUPAC: R = A o G; S = C o G; y para definir el consenso se usó un punto de corte de un 90 % de la representación.

SEQ ID NO.	N.º de ID del Aptámero	Recuento	Pct	Patrón de la Secuencia
Clones de Combinación 5556 (2NapdU)				
153	5556-51	5	15 %	<u>NNARASCS</u> NNNGGCNNINACG AAGNNAACCGAGACGGCCGGCGGAAGCC
154	5556-87	1	3 %	GNNAACCCCGGGGGGGCCCAAGCGC
155	5556-94	1	3 %	ANNNGGCNNINACGAA CAACGNNAANINAGGCCNNINGNCCNAACAAANINACGC
156	5556-89	1	3 %	ANG AANC GGAGCCCNINANAACCCNNAACCCNNINANACCAANIN
Patrón de la Secuencia				
158	5556-51	5	15 %	<u>AAGNNAACCGAGACGGCCGGGAAGCCNNINGGCNNINACG</u> GNNAANINAGGCCNNINGACNINGAACAGGNNIC
159	5556-60	1	3 %	ACGCANINAC
160	5556-57	4	12 %	CNINGACNIGNACCCNNININCGACACAGAAGCCNINAC
161	5556-67	2	6 %	GGACCCGANGAANCNAGCNCNINGNNAANAGCCNINAGCCNANIC
162	5556-83	2	6 %	CACNINAGCAACCGACACAAGNINGNINCCGNINANCCGNINANA

Ejemplo 7. Uso de Aptámeros para Toxina A/B y Toxina Binaria como Reactivos de Diagnóstico: Ensayos de captación

Los aptámeros se usaron para captar de forma específica sus respectivas dianas, toxina A, toxina B, o toxina binaria, de muestras con adiciones, por lo tanto, si fuera necesario, se consigue la purificación por afinidad de estas proteínas.

En este ensayo, los aptámeros biotinilados se inmovilizaron en perlas de estreptavidina MyOne y se mezclaron con sus dianas durante 1 h para permitir la unión. A continuación, las perlas se lavaron, y la diana capturada se etiquetó con NHS-Alexa-647. Después de un amplio lavado, las dianas capturadas se eluyeron con NaOH 20 mM, se neutralizaron, se analizaron por SDS-PAGE, y las proteínas se visualizaron usando el canal cy5.

La Figura 2 ilustra los siguientes resultados del ensayo de captación: el aptámero de la toxina A captó la toxina A (recombinante o nativa) con buena especificidad con respecto a la toxina B o BSA de las proteínas de control; el aptámero de la toxina B captó la toxina B (recombinante o nativa), pero no la toxina A; el aptámero para la subunidad de la toxina A binaria captó a CdtA, pero no a CdtB; y en la fracción de captación no había proteínas presentes cuando se usaba un aptámero aleatorio.

Ejemplo 8. Uso de Aptámeros para Toxina A/B y Toxina Binaria como Reactivos de Diagnóstico: Ensayos de Transferencia Puntual

Los aptámeros se usaron para la detección de toxinas en ensayos de transferencia puntual, por ejemplo usando aptámeros biotinilados y una enzima amplificadora de señales tal como fosfatasa alcalina (AP) o peroxidasa de rábano picante (HRP).

La detección de la toxina se demostró en transferencias puntuales sencillas de toxina A y B (Figura 3A y 3B). En este ensayo, se hicieron transferencias puntuales de 1 μ l de diana diluida en serie y se secó al aire en membranas de nitrocelulosa. Después del bloqueo, se añadieron aptámeros biotinilados individuales (1 nM), seguido de conjugado de SA-AP (200 ng/ml) y se desarrolló con sustrato de NBT/BCIP. Los límites de detección fueron \sim 1 fmol (300 pg) para cualquiera de la toxina A y B con aptámeros. Los anticuerpos monoclonales usados para el mismo ensayo y a la misma concentración (1 nM) no fueron tan buenos, pero también eran capaces de detectar 2 fmoles (600 pg) de toxina A y 20 fmoles (6 ng) de toxina B.

Ejemplo 9. Uso de Aptámeros para Toxina A/B y Toxina Binaria como Reactivos de Diagnóstico: Ensayo de Tomas 1 y 2 con Detección con cPCR

Un ensayo de Toma 1 - Toma 2 se ilustra en la Figura 8. Las toxinas A y B se detectaron de forma cuantitativa mediante cPCR de eluatos de la toma 2 (Figura 4A-B). En la toma 1, las muestras con adiciones que contenían la toxina (0,001 - 10 nM) y BSA en exceso (1,5 μ M) se equilibraron con aptámeros que comprendían un espaciador de biotina-D fotoescindible (10 nM) y se capturó en perlas de estreptavidina agarosa (perlas relativamente transparentes que permiten que la luz pase a través de las mismas). Después de retirada mediante lavado de la proteína libre, la toxina (diana) de las muestras de la toma 1 se etiquetó con NHS-biotina, los aptámeros se retiraron mediante fotoescisión de las perlas de estreptavidina agarosa y los complejos se capturaron en perlas de estreptavidina MyOne (toma 2). Dado que después de la fotoescisión el espaciador de biotina-D fotoescindible ya no podía mediar la unión a las perlas MyOne, en la toma 2 de la unión a las perlas de estreptavidina MyOne se me dio mediante el conjugado de NHS-biotina en la toxina (diana). Después de retirada mediante lavado de los aptámeros libres, los aptámeros unidos a diana se excluyeron a pH elevado y se usaron para cPCR; las curvas patrón para los aptámeros se desarrollaron de lado a lado. Los resultados cuantitativos para la toxina A y B se obtuvieron solamente a concentraciones $>$ 0,1 nM. Había un fondo no específico a concentraciones de diana más bajas, y las curvas de pPCR alcanzaron una meseta después de menos de 12 ciclos. Con la mayor probabilidad esto se debía a un efecto acumulativo considerable de aptámeros libres durante la toma 1 y 2, y debido a una concentración de aptámero bastante elevada (10 nM).

Ejemplo 10. Uso de Aptámeros para Toxina A/B y Toxina Binaria como Reactivos de Diagnóstico: Ensayo de Sándwich de Aptámero-Diana-Anticuerpo

Las toxinas se detectaron en ensayo de sándwich en placa de estreptavidina, usando aptámeros biotinilados y anticuerpos monoclonales (Figura 5A-B).

La detección de la toxina se demostró para las toxinas A y B. Los aptámeros biotinilados (1 pmol/pocillo) se inmovilizaron en una placa de estreptavidina, y se añadieron proteínas diana (1 nM, 100 pM, 10 pM, sin proteína), que corresponde a 100 fmoles (30 ng), 10 fmoles (3 ng), 1 fMol (300 pg), y sin control de proteína. Las placas se lavaron y se añadieron anticuerpos monoclonales a la Toxina A o B (2 nM cada una) y se permitió su unión durante 1 h con agitación a TA. Los complejos se detectaron con conjugado de HRP de cabra-anti-ratón y TMB como sustrato de HRP (Figura 5A y 5B).

El ensayo de sándwich produjo resultados importantes con señales dependientes de la concentración de la diana y fondo bajo. Los cuatro aptámeros de toxina A eran capaces de detectar 10 pM de toxina A (1 fMole, 300 pg) independientemente de sus K_d y no presentaban reacción cruzada con la toxina B. Los aptámeros para la toxina B, a pesar de tener mejores K_d , tenían una baja sensibilidad en este ensayo, debido posiblemente a solapamiento de los sitios de unión del aptámero y anticuerpo. Uno de los aptámeros de toxina B (4937-49) presentó reacción cruzada con la toxina A, que es coherente con datos de los experimentos de captación.

Ejemplo 11. Uso de Aptámeros para Toxina A/B y Toxina Binaria como Reactivos de Diagnóstico: Ensayo de Sándwich de Anticuerpo-Diana-Aptámero

Los aptámeros se usaron para la detección de toxinas en ensayos de sándwich de anticuerpo-aptámero, por ejemplo en un formato de ensayo de tipo varilla de medición, usando aptámeros biotinilados y anticuerpos monoclonales (Figura 6).

Los anticuerpos monoclonales para la toxina A y B se aplicaron puntualmente por separado en una tira pequeña (0,6 cm x 2,5 cm) de nitrocelulosa disecaron al aire. Después del bloqueo con SB18T + BSA al 1 %, las tiras se colocaron verticales en una placa de pocillos profundos y se añadieron muestras de 0,6 ml que contenían toxina A y/o toxina B o controles. Después de agitar durante 1 h a TA las tiras se lavaron 3x. Los aptámeros biotinilados (1 nM) se añadieron (0,6 ml) y se permitió que se unieran durante 1 h a TA. Las tiras se lavaron de nuevo y se desarrollaron con 1 nM de conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (1 h) y NBT/BCIP (Figura 6).

El aptámero 4943-51 de la toxina A detectó la toxina A de forma precisa en todas las muestras que contenían solamente toxina A o ambas toxinas A y B (1000 fMoles o 100 fMoles), y no presentaba reacción cruzada con la toxina B. De forma análoga, los aptámeros de toxina B eran capaces de detectar la toxina B. El fondo era elevado especialmente en la transferencia puntual de la toxina B, incluso cuando no había proteínas presentes en la muestra y cuando se usaban aptámeros de control aleatorios, lo que sugiere una unión no específica del conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina al anticuerpo monoclonal de la toxina B.

Ejemplo 12. Uso de Aptámeros para Toxina A/B y Toxina Binaria como Reactivos de Diagnóstico: Ensayo de Sándwich de Aptámero-Diana-Aptámero

Los aptámeros se usaron para la detección de toxinas en ensayos de sándwich de aptámero-aptámero, por ejemplo un formato de ensayo a base de perlas usando un par de aptámeros, sin la necesidad de ningún anticuerpo (Figura 7).

Las perlas de captura se prepararon mediante la unión del primer, aptámero biotinilado (clon 4758-6) a perlas de estreptavidina MyOne™. Una muestra que contenía proteínas diana (CdtA) se añadió en diluciones en serie, y se permitió que CdtA se uniera a estas perlas de captura. Después de lavar las perlas, se añadió un segundo, clon de aptámero de CdtA radioetiquetado se añadió a la unión en equilibrio. A continuación, la mezcla se filtró a través de placas MAHVN (0,22 μ), usando las propias perlas de captura para el reparto. Este método solamente detectará los aptámeros etiquetados que se unen en formato de tipo sándwich al complejo de estreptavidina-aptámero 4758-6-CdtA.

Los resultados del ensayo de captura en perlas para los pares de aptámeros de CdtA se muestran en la Figura 7. Los pares de aptámeros adecuados produjeron señales dependientes de la concentración de la diana. No se producían señales si se usaba el mismo aptámero (unión al mismo epítipo) o un aptámero de control (unión a diferente diana).

Este ensayo se puede usar para identificar sistemáticamente aptámeros para unión a distintos epítipos en la diana, es decir, cada aptámero se une a un sitio separado, en oposición a la competición por el mismo epítipo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SomaLogic, Inc.

<120> APTÁMEROS PARA DIAGNÓSTICO DE *C. DIFFICILE*

<130> 0057.41

<150> 61/451.227

<151> 10-03-2011

<160> 170

<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 629 183 T3

<210> 1
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU
 10
 <400> 1
 aannccnanc cnanncanca cnnncnaga nnanncnang 40
 <210> 2
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-naftilmetilcarboxiamida-dU
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-naftilmetilcarboxiamida-dU
 25
 <400> 2
 gncannngc cccacgnanc nancngacnn cgacnaacga 40
 <210> 3
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-naftilmetilcarboxiamida-dU
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-naftilmetilcarboxiamida-dU
 45
 <400> 3
 acnngnagna gccnnaann gggngcgnc ggcannangg 40
 <210> 4
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-naftilmetilcarboxiamida-dU
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-naftilmetilcarboxiamida-dU
 60
 <400> 4
 cncgnnagg nnnanccaan accngnggc cnaacnaaa 40
 65
 <210> 5
 <211> 16

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 10 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 15 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 20 <223> n = A, G, C o 5-triptaminocarboxiamida-dU

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(10)
 25 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 30 <223> n = A, G, C o 5-triptaminocarboxiamida-dU

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 35 <223> n = A, G, C o 5-triptaminocarboxiamida-dU

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 40 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

 <400> 5
 nananncnncnncnn 16

 45 <210> 6
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 55 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

 <400> 6
 60 agcannaaan nanagacnncnncncncgnc ccccnncggn 40

 <210> 7
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

10 <400> 7
 ancncncaca nnanagacnn ncncanggn ccncngaga 40

15 <210> 8
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(32)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

30 <400> 8
 ngcnaaac nanaaccnnc ccacgngnac nn 32

35 <210> 9
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> 5-triptaminocarboxiamida-dU

50 <400> 9
 gnanancaac ncgncanggn agcgnaannc nagcnnaga 39

55 <210> 10
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

<400> 10
 ccngacgggc gaggnccaa cncacnccg ncacnanngc 40

60 <210> 11
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(10)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 5
 <400> 11
 naaagnaggn 10
 <210> 12
 10 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 20 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <400> 12
 cgcangngnn cnganacacn ggccnaaagn aggnncngnag 40
 25 <210> 13
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 35 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <400> 13
 ccgnnncnaan accaanggan aaagnaggna ggagcncgca 40
 40 <210> 14
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 50 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <400> 14
 55 naccaganag nnanaanacg cnggcnaaag naggnacnaa 40
 <210> 15
 <211> 13
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (2)..(3)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n = A o G

 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n = A o C

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n = g o 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 35 <400> 15
 gnnnncnncnga 13

 <210> 16
 <211> 38
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 50 <400> 16
 cnaaangaag nngncagn n gacgccagng cgnaccgn 38

 <210> 17
 <211> 40
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 65

<400> 17
 ngcgnaccgc cngnngncag ncnagagan cggcnaagaa 40

5 <210> 18
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

<400> 18
 cnagngcan accccacggn gncagncnga gcgcccacn 39

20 <210> 19
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

35 <400> 19
 ngccngccca ccngnngnca gncngagagc nanccaaaca40

40 <210> 20
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

50 <400> 20
 cangcngca naccacacgn nggnagncng agggnnagg 39

55 <210> 21
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

<400> 21
 ggnaccnacc cgcagngnna ncanncngac cgcgacnnn 40

<210> 22
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 10
 <400> 22
 cngnnanccg ncngacacn accnaccgga gnaagancc 39
 <210> 23
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 25
 <400> 23
 cgggncgnga cagancgca 19
 <210> 24
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 40
 <400> 24
 cgagcgggnc gngacaganc gcagagcgaa ggcnnacnac 40
 <210> 25
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 60
 <400> 25
 ncngangggc caacaaangn ccgggncgng acagancgca 40
 <210> 26
 <211> 40

- <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
<223> Las modificaciones son 5-fenetil-1-carboxiamida
- 10 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida
- <400> 26
gcnaggccg ngcncannaa nngaacnag aananccna 40
- 15 <210> 27
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
<223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
- 25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
- 30 <400> 27
accgnaaag naggncacgn ncaanacc ngggagngn 40
- 35 <210> 28
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
- 45 <220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(11)
<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
- 50 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n = A, G, C o 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
- 55 <220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
- 60 <220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
- 65 <220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)

<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

5 <400> 28
naccgaacgn nncagncng a 21

<210> 29
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

20 <400> 29
gcngccnacc gaacgnngnc agncngagcg ancgaaacng 40

25 <210> 30
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

35 <400> 30
agccacgnac anaccgaacg nnancagncn gacgcngnga 40

40 <210> 31
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

55 <400> 31
ccngncanac cccccngnng ncagncngac ggccagacac 40

60 <210> 32
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n = C o 5-tirosilcarboxiamida-dU

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> n = C o G
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n = A o 5-tirosilcarboxiamida-dU
 20

<400> 32
 nnnnnngaan 10

<210> 33
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU
 35

<400> 33
 nannnccnna aggcnnngng aaaaccgcnn nncggngngcg 40

<210> 34
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU
 50

<400> 34
 nggaccacna nccncccca cnnnnncgng aacngagnn40
 55

<210> 35
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)

	<223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU	
5	<400> 35 nggancacgn anncccacnn accnncnga aanagcann	40
	<210> 36 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU	
15	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU	
20	<400> 36 acnngngaa annacnnc ngccagcanc nanncccgn	40
	<210> 37 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU	
30	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(43) <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU	
35	<400> 37 nnggcacgaa gnannacnn ngaanngcng aaacancnn ncn	43
40	<210> 38 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU	
50	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(35) <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU	
	<400> 38 nggacaccna nnacagncnn cgngaaanng cannn	35
55	<210> 39 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU	
65	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(38) <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU	

	<400> 39 gngcngccca ncnanccnch cnngaanc cgaanncc	38
5	<210> 40 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU	
15	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU	
20	<400> 40 nccannccac cgcgngccca cagnancang nnngcngaan	40
25	<210> 41 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU	
35	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU	
40	<400> 41 nccnanccnc ncnngcngaa nccgaanngc cnaengccnn	40
45	<210> 42 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU	
55	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(41) <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU	
60	<400> 42 ncacaaacna nccgnccnn ggngaannch caannncngg n	41
65	<210> 43 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU	
	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU	
	<400> 43 nacnancag cnnnngnga anngcgaann cccggagggn	40

<210> 44
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU
 <400> 44
 15 aggcgggn ncanancccg caanngaang cacgcnncc 40
 <210> 45
 <211> 39
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU
 30 <400> 45
 gngaccaach angnanncn cgngaancg aanngccgn 39
 <210> 46
 <211> 39
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU
 45 <400> 46
 cacacnannc ccnaccanga nngngaaan agcannncn 39
 <210> 47
 <211> 6
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 60 <223> n = C o 5-tirosilcarboxiamida-dU
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 65 <223> n = A o 5-tirosilcarboxiamida-dU

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU
 5
 <400> 47
 ngaann 6
 <210> 48
 10 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(36)
 20 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU
 <400> 48
 cnnacngaancnngagcaa canccccgan ngccga 36
 25 <210> 49
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 35 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU
 <400> 49
 40 gngcngccca ncnanccnncn cnnangaanc cgaanncc 38
 <210> 50
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 50 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU
 <400> 50
 55 nccnanccnncn ncnncngaa nccgaanngc cnacngccnn 40
 <210> 51
 <211> 39
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(39)
 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU

5 <400> 51
 gngaccaacn angnnancnn cgngaancg aanngccgn 39

<210> 52
 <211> 39
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU

20 <400> 52
 aaccnngnan nccacaccnn gccgaaanng annncnngn 39

25 <210> 53
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU

35 <400> 53
 accangnann acccncnng gccgaaanca gannncngg 39

40 <210> 54
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 50 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU

<400> 54
 nancnancag cnnnngngga anngcgaann cccggagggn 40

55 <210> 55
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(36)
 65 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU

ES 2 629 183 T3

	<400> 55 ncnanncccc gagncnngan anccacgann gaannn	36
5	<210> 56 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU	
15	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(43) <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU	
20	<400> 56 nnggcacgaa gnangacnn ngaanngcng aaacancnnn ncn	43
25	<210> 57 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU	
35	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(41) <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU	
40	<400> 57 ncacaaacna nccgnncnn ggngaanncn caannncngg n	41
45	<210> 58 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU	
55	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU	
60	<400> 58 nnaaccggn ngcanncac angaaannag gaggacancg	40
65	<210> 59 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU	
	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU	
	<400> 59 gagcnaang aagcnacagg acncnnggca cgacgggna	40

ES 2 629 183 T3

<210> 60
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU
 <400> 60
 15 nggancacgn annccacn accnccnga aanagcann 40
 <210> 61
 <211> 40
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU
 30 <400> 61
 ggncncang acaaannngg aangngcgag cacnanncg 40
 <210> 62
 <211> 40
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-tirosilcarboxiamida-dU
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-tirosilcarboxiamida-dU
 45 <400> 62
 gggncagna ncngcagagc cagnaggaac nagacggngn 40
 <210> 63
 <211> 40
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-benzilcarboxiamida-dU
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 60 <223> n = 5-benzilcarboxiamida-dU
 <400> 63
 nnggcgccgn nngcggnang acnccnncn cnnanggcng 40
 65 <210> 64
 <211> 39

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Las modificaciones son 5-benzilcarboxiamida-dU

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 10 <223> n = 5-benzilcarboxiamida-dU

 <400> 64
 agngcnagcg acnccgcggn acnacnncnc ccnacnagn 39

 15 <210> 65
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-benzilcarboxiamida-dU

 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-benzilcarboxiamida-dU

 <400> 65
 nanaaaganc nngccnnngn aannccncan gacanaaana 40
 30
 <210> 66
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-naftilmetilcarboxiamida-dU

 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n = G o 5-naftilmetilcarboxiamida-dU

 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n = C o G

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> n = 5-naftilmetilcarboxiamida-dU

 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n = A o G

 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n = A o 5-naftilmetilcarboxiamida-dU

 <400> 66
 65 nngannngnn 10

ES 2 629 183 T3

<210> 67
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-naftilmetilcarboxiamida-dU
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-naftilmetilcarboxiamida-dU
 <400> 67
 15 nccnnngcga ancggganng gannacggnn gggcaanagn 40
 <210> 68
 <211> 39
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-naftilmetilcarboxiamida-dU
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> n = 5-naftilmetilcarboxiamida-dU
 30 <400> 68
 aggcncang gnngnancgan nggaaagcag nnaancgan 39
 <210> 69
 <211> 40
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-naftilmetilcarboxiamida-dU
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-naftilmetilcarboxiamida-dU
 45 <400> 69
 ggcncagnn ggngganng ggagnnggaa nnagnagca 40
 <210> 70
 <211> 40
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-naftilmetilcarboxiamida-dU
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 60 <223> n = 5-naftilmetilcarboxiamida-dU
 <400> 70
 ngggncncaa gnnggnnggc ccanngggan nggaagnccn 40
 65 <210> 71
 <211> 40

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <223> Las modificaciones son 5-naftilmetilcarboxiamida-dU

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 10 <223> n = 5-naftilmetilcarboxiamida-dU

<400> 71
 cccngcgcng annngcaann agcacggcng nccgngaacn 40

15 <210> 72
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-naftilmetilcarboxiamida-dU

<220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-naftilmetilcarboxiamida-dU

<400> 72
 30 nccancggga ccacnaacgn nagnccagg cgggacngnc 40

<210> 73
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-naftilmetilcarboxiamida-dU

<220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (1)..(39)
 <223> n = 5-naftilmetilcarboxiamida-dU

<400> 73
 45 nancagaccn ccancgcgnc acnnangagn ngaacacga 39

<210> 74
 <211> 40
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-naftilmetilcarboxiamida-dU

<220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-naftilmetilcarboxiamida-dU

<400> 74
 60 nannngnccc anncccacnn aangcnagca cacgnaaca 40

<210> 75
 <211> 23
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

- <220>
<223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU
- 5 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU
- 10 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n = A, G, C o 5-triptaminocarboxiamida-dU
- 15 <220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n = C o 5-triptaminocarboxiamida-dU
- 20 <220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(7)
<223> n = A, G, C o 5-triptaminocarboxiamida-dU
- 25 <220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU
- 30 <220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(11)
<223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU
- 35 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n = A, G, C o 5-triptaminocarboxiamida-dU
- 40 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n = A o G
- 45 <220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n = A o 5-nripraminocarboxiamida-dU
- 50 <220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n = 5-nripraminocarboxiamida-dU
- 55 <220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n = A o C
- 60 <220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n = A o C
- 65 <220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)

<223> n = C o G
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (22)..(22)
 <223> n = C o 5-nriprnaminocarboxiamida-dU
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (23)..(23)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU
 <400> 75
 15 nncnnnnncn nnaannnnan nnn 23
 <210> 76
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU
 <400> 76
 30 cangncncaa ncnnaagan aacgnngacc gcgagnaccg 40
 <210> 77
 <211> 40
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU
 45 <400> 77
 ngcngacaga cacangnccc cncncnaaa ganaacgnng 40
 <210> 78
 <211> 40
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU
 60 <400> 78
 ancacccnc nnaaganaa cgnnccggac cgcgcanaa 40
 <210> 79
 <211> 40
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU
 10
 <400> 79
 ncngcnagn cnnnaaganc aaccnaagag angcangana 40
 <210> 80
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(41)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU
 25
 <400> 80
 gnnggagcgn ngnggcnnca ccnnacngga ncnngaaccn c 41
 <210> 81
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU
 40
 <400> 81
 gncgancnc aaannangna cganngaccn aacanggnac 40
 <210> 82
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(41)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU
 55
 <400> 82
 nggnnagcac nncanncang gaccananaa cncnagnnna a 41
 <210> 83
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n = A, G, C o 5-triptaminocarboxiamida-dU

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n = A, G, C o 5-triptaminocarboxiamida-dU

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

35 <400> 83
 cnngnancng gaaan 15

40 <210> 84
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

55 <400> 84
 acnnnncgca cccggccnna ngccnngcan cnggaaangg40

60 <210> 85
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

<400> 85
 nnnncggaag cgcnnancc gcccaacnccg ancnggaaan40

5 <210> 86
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

<400> 86
 ngncgagna acggcgaccg nnnccccngn agnaacnaca 40

20 <210> 87
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

35 <400> 87
 ngnnncaacn angaanccag cnaccngca accaangna 39

40 <210> 88
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

55 <400> 88
 agngnaanag naaccnnag acnangccn ngggnancgg 40

60 <210> 89
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU

<400> 89
 ngcggcngaa gaagcangca agncancggn ccgnngn 40

<210> 90
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n = A, G, C o 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n = A, G, C o 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(7)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(18)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n = A, G, C o 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(29)
 <223> n = A, G, C o 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> n = A, G, C o 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(34)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> n = A, G, C o 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(37)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

65

<400> 90
 ancnnnaag ngaacnnna nnnnnnnng ngnnana 38

ES 2 629 183 T3

<210> 91
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 10
 <400> 91
 ccagcannna agngaacnnn aaggaaggga ggagncana 40
 <210> 92
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 25
 <400> 92
 agaccgnna agngaacnnn caacgggang cgngnaana 40
 <210> 93
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 40
 <400> 93
 agngcgna angcannnaa cgagcacnga ggcgnaana 40
 <210> 94
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 55
 <400> 94
 cnnnnnacc gcngcangac nnnagcggca gncgngngng 40
 <210> 95
 <211> 34
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-fenetil-1-carboxiamida

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(34)
 <223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida

15
 <400> 95
 gccnncnng nnaaacgncc nnganggacg cgnn 34

20
 <210> 96
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-fenetil-1-carboxiamida

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida

35
 <400> 96
 gaacngccn nncnngnaa acgnccnnga nggcagcgnn 40

40
 <210> 97
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-fenetil-carboxiamida

50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida

55
 <400> 97
 aacncggccn nncnngnaa acgnccnnga nggcagcgnn 40

60
 <210> 98
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-fenetil-1-carboxiamida

70
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(11)
 <223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida

75
 <400> 98
 agnnngancc c 11

80
 <210> 99
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

	<220> <223> Las modificaciones son 5-fenetil-1-carboxiamida	
5	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida	
10	<400> 99 nacggcannc ngngggcaag nnnngancccn cggagccnan	40
15	<210> 100 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Las modificaciones son 5-fenetil-1-carboxiamida	
25	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida	
30	<400> 100 cgancacanc gcacannagn cagnnnganc ccannaanca	40
35	<210> 101 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> Las modificaciones son 5-fenetil-1-carboxiamida	
45	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida	
50	<400> 101 ncaggnana cccagnnag gaaaacngn acgnnccgan	40
55	<210> 102 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> Las modificaciones son 5-fenetil-1-carboxiamida	
65	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida	
70	<400> 102 aannnangng ancaannag cagaccgcca nngacnncg	40
75	<210> 103 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
80	<220> <223> Las modificaciones son 5-fenetil-1-carboxiamida	

ES 2 629 183 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida
 5
 <400> 103
 ggngngggaa anngcaagn gnangnggn nacgccgnan 40
 <210> 104
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-fenetil-1-carboxiamida
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida
 20
 <400> 104
 ngcgncngan ccgnaaaacc anncaagcn accangnna 40
 <210> 105
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-fenetil-1-carboxiamida
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida
 35
 <400> 105
 cgccgnncc gnccggccac aannaagna caanngan 39
 <210> 106
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-fenetil-carboxiamida
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida
 50
 <400> 106
 ngncccgga ccannncng nanagccncn ngnaannagn 40
 <210> 107
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 65
 <220>
 <221> misc_feature

ES 2 629 183 T3

	<222> (1)..(40)	
	<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
5	<400> 107 gaaagcncg nacgnagng ngagagncn cngcccncn	40
	<210> 108	
	<211> 40	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(40)	
	<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
20	<400> 108 annaagcng nggcngnag cngacagcca ggganncnga	40
	<210> 109	
	<211> 40	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Las modificaciones son 5-triptaminocarboxiamida-dU	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(40)	
	<223> n = 5-triptaminocarboxiamida-dU	
35	<400> 109 gaagacnna anncngacan gngncnaan ggcgcgcgag	40
	<210> 110	
	<211> 29	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (4)..(4)	
50	<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (6)..(6)	
55	<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (7)..(7)	
60	<223> n = A, G, C o 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (8)..(8)	
65	<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n = A, G, C o 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> n = A, G, C o 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(28)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n = C o G
 40

<400> 110
 gaanannccgngangnaangnnanannn 29

<210> 111
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(28)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 55

<400> 111
 gaancngcc gngacgnaan gaanannc 28

<210> 112
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 5
 <400> 112
 gaancngncc gngacgnaan gccananncg gagggan 38
 <210> 113
 10 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(34)
 20 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <400> 113
 gaancngncc gngaagnaan gccananncg cang 34
 25 <210> 114
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (1)..(29)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <400> 114
 gaanangncc gngaagnaan gcganannc 29
 40 <210> 115
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <400> 115
 gaanangncc gngaagnaan gccananncg nccacngggg 40
 <210> 116
 <211> 40
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 65 <220>
 <221> misc_feature

ES 2 629 183 T3

	<222> (1)..(40)	
	<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
5	<400> 116 cgggncaccg canncnccgn gacgnaanga cananncggn	40
	<210> 117	
	<211> 40	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(40)	
	<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
20	<400> 117 aaccgccgg caannanccg ngaagnaang aananncgga	40
	<210> 118	
	<211> 40	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(40)	
	<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
35	<400> 118 acagaggcan ncnccgngan gnaangcaan anccgccgn	40
	<210> 119	
	<211> 40	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(40)	
50	<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
	<400> 119 ngcaacnanc cgngangnaa ngcaananng caacangngc	40
55	<210> 120	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
	<220>	
	<221> misc_feature	
65	<222> (1)..(40)	
	<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	

ES 2 629 183 T3

	<400> 120 ggacnacncn ccgngangna angcgaaann cccagangna	40
5	<210> 121 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
15	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
	<400> 121 ncgaangana acangnaacn ccgngannac ancgaanagn	40
20	<210> 122 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
30	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
35	<400> 122 cnaagcncgcg aggcnnacnc cgngancgca nggnnaacc	40
40	<210> 123 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
50	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
55	<400> 123 ncgagcaacg agnaacncgcg ngannacaan cganaganga	40
60	<210> 124 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
	<220> <221> misc_feature <222> (2)..(3) <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
	<220> <221> misc_feature	

- <222> (4)..(4)
<223> n = A o G
- 5 <220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
- 10 <220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> n = A, G, C o 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
- 15 <220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
- 20 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n = C o G
- 25 <400> 124
annngcnnccngcn 15
- 30 <210> 125
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n = A o 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
- 40 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n = A o 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
- 45 <220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
- 50 <220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(8)
<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
- 55 <400> 125
nannnanna 9
- 60 <210> 126
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 65 <220>
<223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 5
 <400> 126
 nngcnacca annagcncn ggcggnnaa nnannagaca 40
 <210> 127
 10 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 20 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <400> 127
 canccaanna gcncncngc gangnaanna nnanggcacn 40
 25 <210> 128
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 35 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <400> 128
 ncgnanaccg aannagcngc cngcgacn aannannaca 40
 40 <210> 129
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 50 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <400> 129
 55 ccngcncan nagnccngg cgccnnaan nannaaaacn40
 <210> 130
 <211> 40
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 <400> 130
 5 gaccncanca nnggcncng gccggnaaannannaccacc 40

 <210> 131
 <211> 40
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 20 <400> 131
 nagagaaann ggcngcngg ccaccnaaannannagagca 40

 <210> 132
 <211> 40
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 35 <400> 132
 cncaggcna nnggcncng gcagannaannannaaagnc 40

 <210> 133
 <211> 40
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 45 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 50 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 <400> 133
 anngcncn gccgganaannannacc agngagngaa 40

 55 <210> 134
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 65 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n = A o C
 10

<400> 134
 gganngcagg nncnc 15

<210> 135
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 25

<400> 135
 nagnacggn gaacnggann gcaggnccc cccnggca 39

<210> 136
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 35

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

<400> 136
 ggncagcngg anngcaggn cccccngan aggacggnn 40
 45

<210> 137
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 60

<400> 137
 gnagcggan ngcaggncc caccaaacac cnnnggnaga 40

<210> 138
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65

	<220> <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
5	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
10	<400> 138 cnggagacng gncagaacag ccggganngc aggnncacgg	40
15	<210> 139 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
25	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(11) <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
	<400> 139 gaanngncc g	11
30	<210> 140 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
40	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
	<400> 140 gnngaanngn nccgcccn nncngnccgc gggngcngn	40
45	<210> 141 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
55	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(38) <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
	<400> 141 ngncagaann gnccganag ggngcngcc acnganan	38
60	<210> 142 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(40)	
5	<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
	<400> 142	
	gccnnnnggc gagngagann nncccagncn gangaagcnn	40
10	<210> 143	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(40)	
	<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
	<400> 143	
	cggagcccga aggnnaagcg gnnccaccann anacganacg	40
25	<210> 144	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
35	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(40)	
	<223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
40	<400> 144	
	cnccgnanng cgncngggc agnnaancna nnagaagcca	40
45	<210> 145	
	<211> 9	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Las modificaciones son 5-fenetil-carboxiamida	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> n = 5-fenetil-carboxiamida	
60	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (7)..(9)	
	<223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida	
65	<400> 145	
	naaangnnn	9

ES 2 629 183 T3

<210> 146
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-fenetil-1-carboxiamida
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida
 <400> 146
 15 gngngncagc gcannnacg cgnaannaaa ngnnnagaga 40
 <210> 147
 <211> 40
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-fenetil-1-carboxiamida
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida
 30 <400> 147
 gcgngncngn annaaaagnn ngcggagggg nccccggnac 40
 <210> 148
 <211> 40
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-fenetil-carboxiamida
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-fenetil-carboxiamida
 45 <400> 148
 nnncgagaan aaangnnnga nacannacn anaanggn 40
 <210> 149
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-fenetil-carboxiamida
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 60 <223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida
 <400> 149
 agccgngng ngnannaacn cnnccggcnn nccnccgca 40
 65 <210> 150
 <211> 40

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220> <223> Las modificaciones son 5-fenetil-1-carboxiamida	
10	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-fenetil-1-carboxiamida	
	<400> 150 cnngngnaaa ccgngcgna gnannggaga nagcngacan	40
15	<210> 151 <211> 8 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
25	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(2) <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
30	<220> <221> misc_feature <222> (4)..(4) <223> n = A o G	
35	<220> <221> misc_feature <222> (6)..(6) <223> n = C o G	
40	<220> <221> misc_feature <222> (8)..(8) <223> n = C o G	
45	<400> 151 nnanancn	8
50	<210> 152 <211> 12 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
60	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(12) <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
65	<400> 152 nnnggcnnna cg	12
65	<210> 153 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	

	<220> <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
5	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
10	<400> 153 aagnnaaacc gagacgcggc cggaagccnn nggcnnnacg	40
15	<210> 154 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
25	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
30	<400> 154 gnnaaacccc gggggggcca agcgcanng gcnnnacgaa	40
35	<210> 155 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
45	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
50	<400> 155 caacgnnaan nagagccnnn gncnaacaa annacgang	40
55	<210> 156 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
65	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(40) <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	
	<400> 156 aancggagcc cnnanaacc nnaaacccnn nanaccaann	40
60	<210> 157 <211> 12 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida	

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(7)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n = A o G
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 15

<400> 157
 agccnngnc nn 12

<210> 158
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 30

<400> 158
 aagnnaaacc gagacgcggc cggaagccnn nggcnnnac 40

<210> 159
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 45

<400> 159
 gnaannaga gccnngacn ngaacaggnn cacgcannac 40

<210> 160
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50

<220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 60

<400> 160
 cnngacngna cnnnnncga cacagaacag caagaccnnc 40
 65

ES 2 629 183 T3

<210> 161
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 <400> 161
 15 ggaccganga ancnagcnng nnaanagcgn ngagcnancc 40
 <210> 162
 <211> 40
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Las modificaciones son 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> n = 5-(2-naftilmetil)carboxiamida
 30 <400> 162
 cacnagcaa ccgacacaag nngnncggn anccggnana 40
 <210> 163
 <211> 39
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador para tcdA
 40 <400> 163
 gcgcaagctt cttcaaatg gatattac tattgaaag 39
 <210> 164
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Cebador para tcdA
 <400> 164
 gcgagctc catatatccc aggggcttt ac 32
 55 <210> 165
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador para tcdB
 <400> 165
 65 gcgcaagctt atgagtttag ttaatagaaa acagttag 38

<210> 166
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador para tcdB
 <400> 166
 10 gcgcgagctc catcttcacc aagagaacct tc 32
 <210> 167
 <211> 32
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador para cdtA
 20 <400> 167
 gcgcaagctt caagacttac aaagctatag tg 32
 <210> 168
 <211> 32
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador para cdtA
 30 <400> 168
 gcgcgagctc caggtatcaa tgttgcatca ac 32
 <210> 169
 <211> 29
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador para cdtB
 40 <400> 169
 gcgcaagctt caaactagta caagtaatc 29
 <210> 170
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador para cdtB
 <400> 170
 55 gcgcgagctc ggtcaaagaa attgtattt ggg 33

REIVINDICACIONES

1. Un aptámero que se une a la Toxina B de *C. difficile* en donde dicho aptámero comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 66-74, 32-65 y 75-108.
5
2. El aptámero de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho aptámero comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 66-74.
3. El aptámero de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde dicho aptámero comprende además al menos una modificación química adicional, en donde dicha al menos una modificación química adicional es una sustitución química en una o más posiciones seleccionadas independientemente entre el grupo que consiste en una posición de ribosa, una posición de desoxirribosa, una posición de fosfato y una posición de base, o en donde dicha al menos una modificación química adicional se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en una modificación de azúcar en la posición 2', una modificación en la posición 2'-amino (2'-NH₂), en la posición 2'-fluoro (2'-F), en la posición 2'-O-metilo (2'-OMe) en una amina exocíclica de citosina, una sustitución de 5-bromouracilo, una sustitución de 5-bromodesoxiuridina, una sustitución de 5-bromodesoxicitidina, una modificación de estructura principal, metilación, una protección en la posición 3' y una protección en la posición 5'.
10
15
4. El aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el aptámero comprende una K_d para la Toxina B de *C. difficile* de 30 nM o inferior.
20
5. Un método para detectar la presencia de la Toxina B de *C. difficile* en una muestra de ensayo, que comprende poner en contacto dicha muestra de ensayo con un aptámero que se une a la Toxina B de *C. difficile*, en donde dicho aptámero comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 66-74, 32-65 y 75-108.
25
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho aptámero comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 66-74.
7. El método de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6, en el que dicho aptámero comprende además al menos una modificación química adicional, en donde dicha al menos una modificación química adicional es una sustitución química en una o más posiciones seleccionadas independientemente entre el grupo que consiste en una posición de ribosa, una posición de desoxirribosa, una posición de fosfato y una posición de base, o dicha al menos una modificación química adicional se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en una modificación de azúcar en la posición 2', una modificación en la posición 2'-amino (2'-NH₂), en la posición 2'-fluoro (2'-F), en la posición 2'-O-metilo (2'-OMe) en una amina exocíclica de citosina, una sustitución de 5-bromouracilo, una sustitución de 5-bromodesoxiuridina, una sustitución de 5-bromodesoxicitidina, una modificación de estructura principal, metilación, una protección en la posición 3' y una protección en la posición 5'.
30
35
8. El método de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6, en donde el método de detección se selecciona entre un ensayo de captación, un ensayo de transferencia puntual, un ensayo de PCR o un ensayo de sándwich.
40
9. El método de la reivindicación 8, en el que el ensayo de sándwich es (i) un ensayo de aptámero-diana-anticuerpo en el que el aptámero está inmovilizado en un sustrato y el anticuerpo se usa para detectar una diana unida al aptámero inmovilizado, o (ii) un ensayo de anticuerpo-diana-aptámero en el que el anticuerpo está inmovilizado en un sustrato y el aptámero se usa para detectar una diana unida al anticuerpo inmovilizado, o (iii) un ensayo de aptámero-diana-aptámero en el que un primer aptámero está inmovilizado en un sustrato y un segundo aptámero se usa para detectar una diana unida al primer aptámero inmovilizado.
45
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en donde el método de detección proporciona una medida cuantitativa de Toxina B producida por *C. difficile*.
50

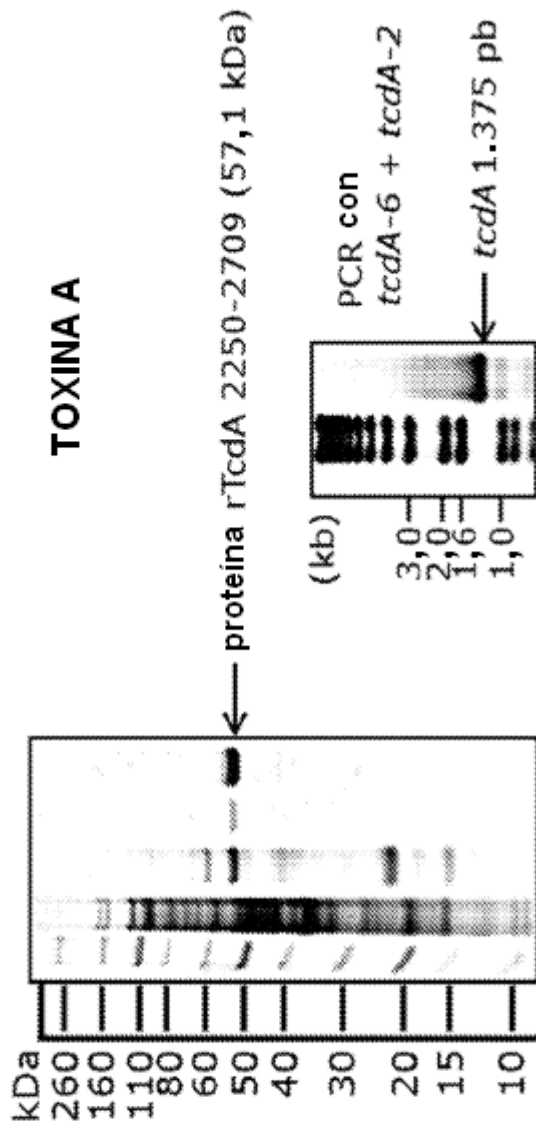


FIG. 1A



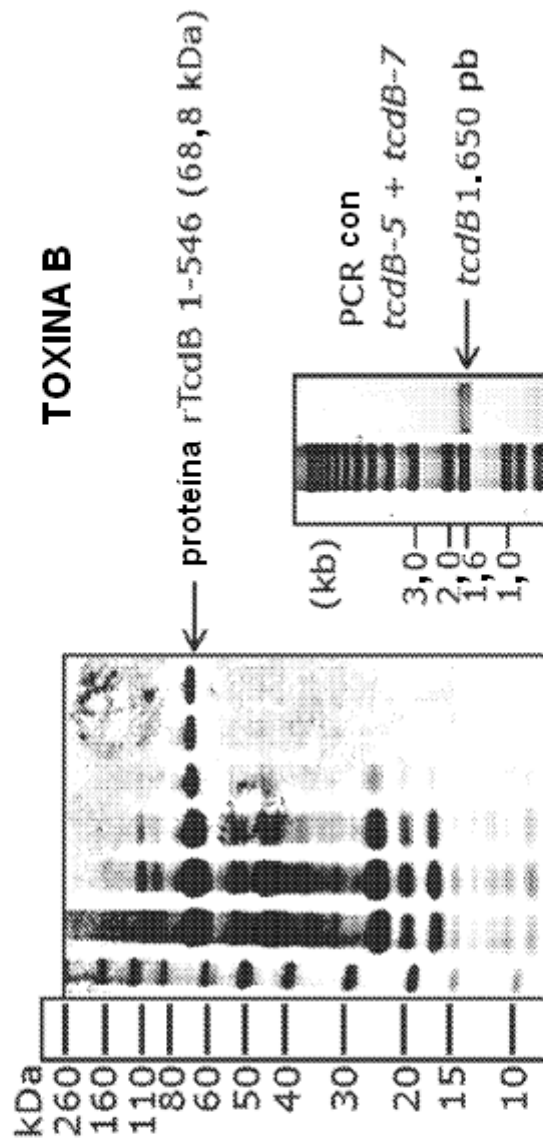


FIG. 1B



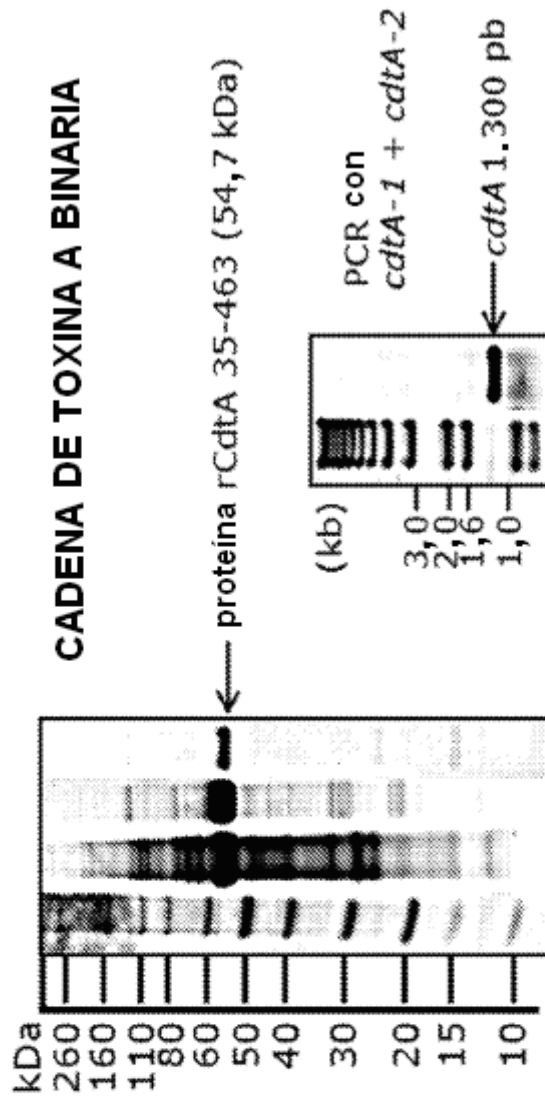


FIG. 1C

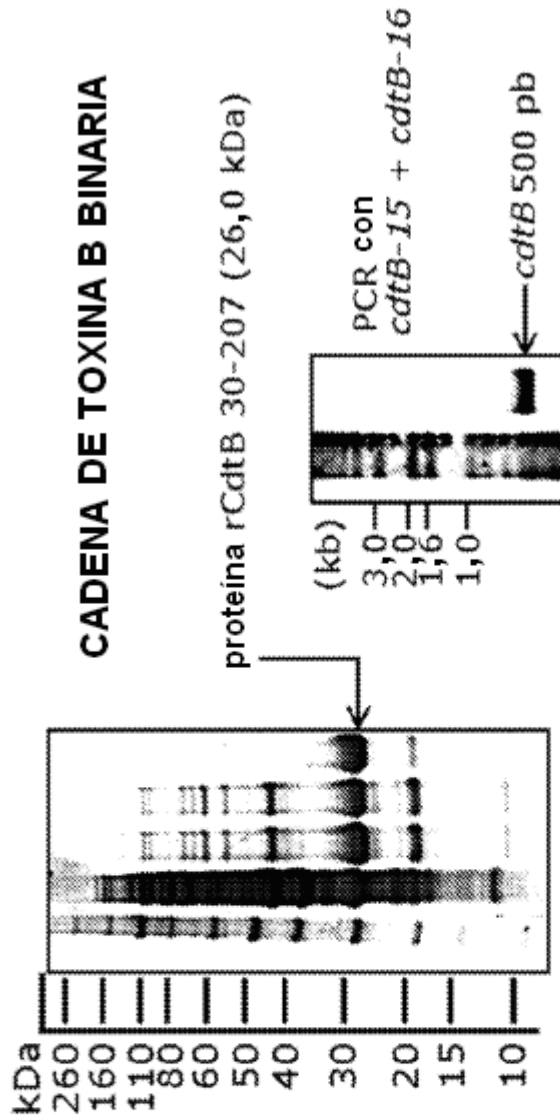


FIG. 1D

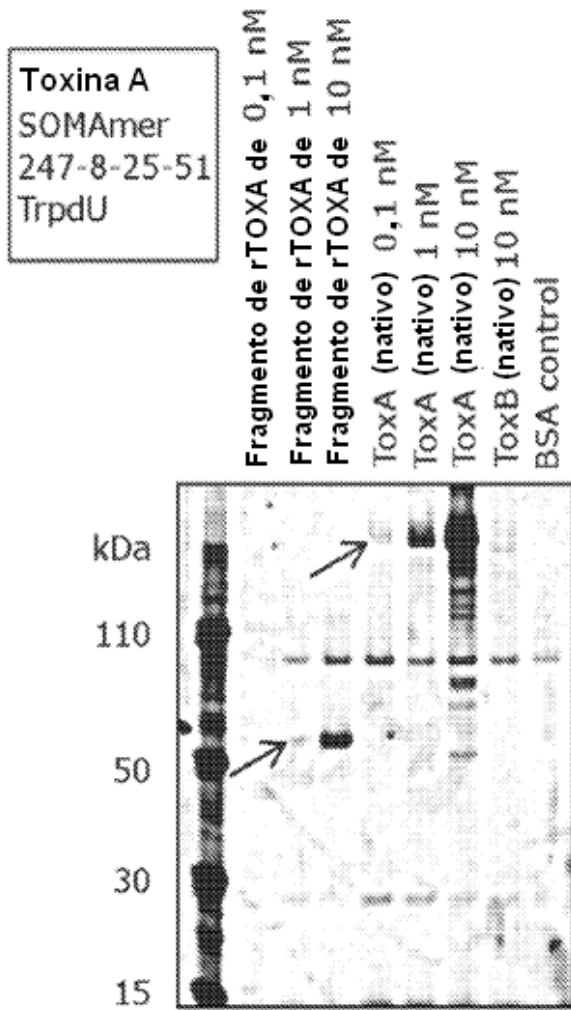


FIG. 2A

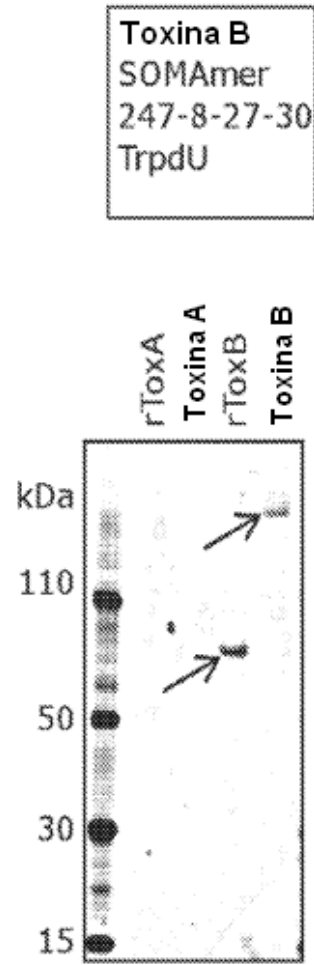


FIG. 2B

Toxina Binaria
SOMAmer
239-7-39-6
TrpdU

Aleatoria
SOMAmer
TrpdU

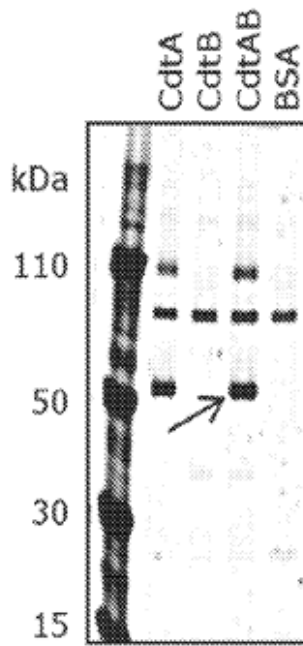


FIG. 2C

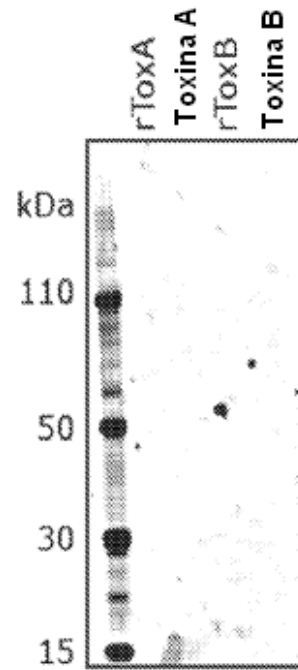


FIG. 2D

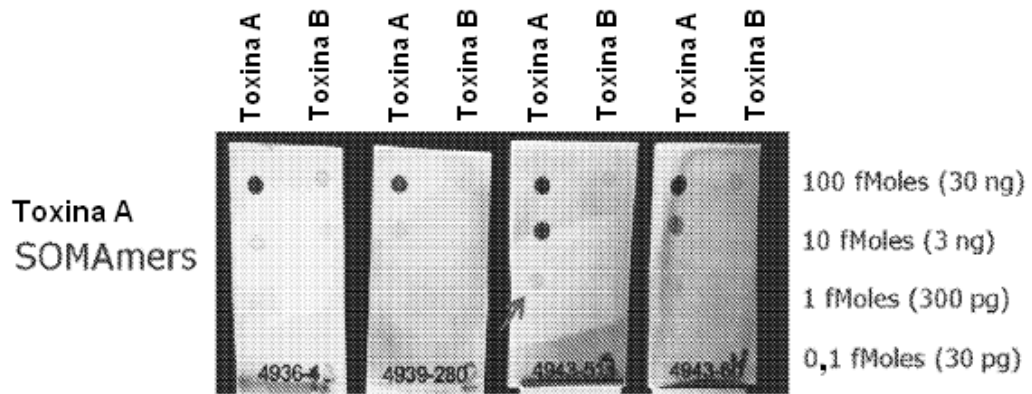


FIG. 3A

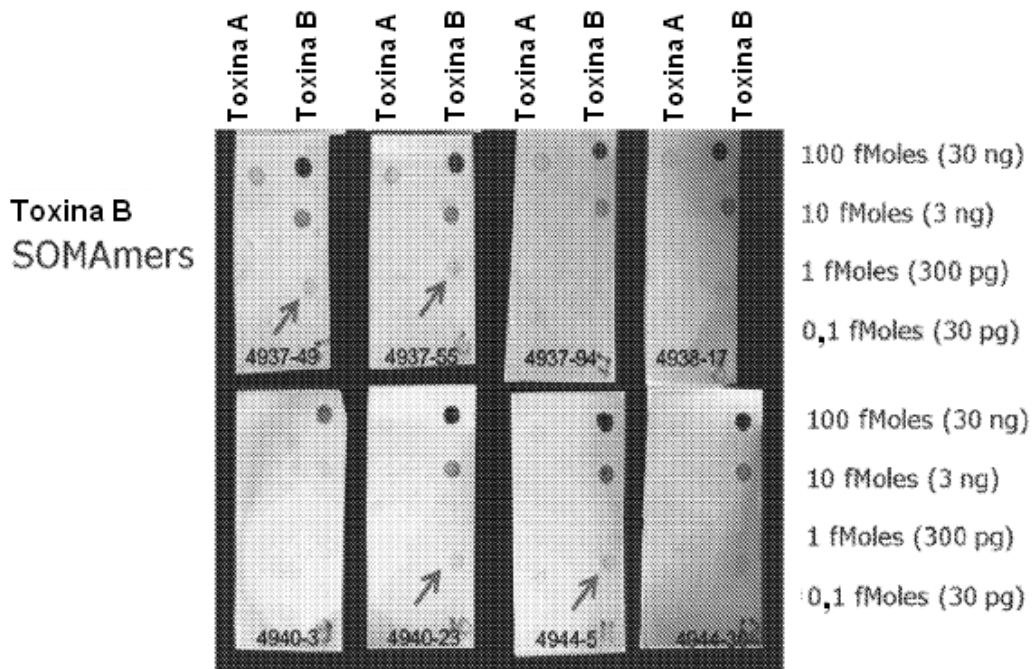
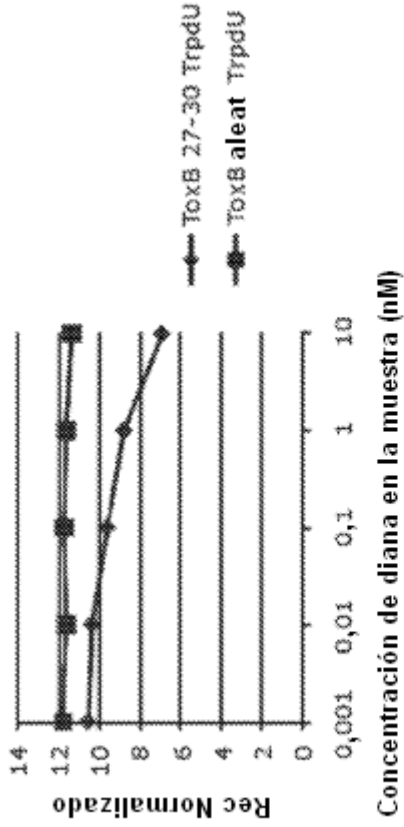
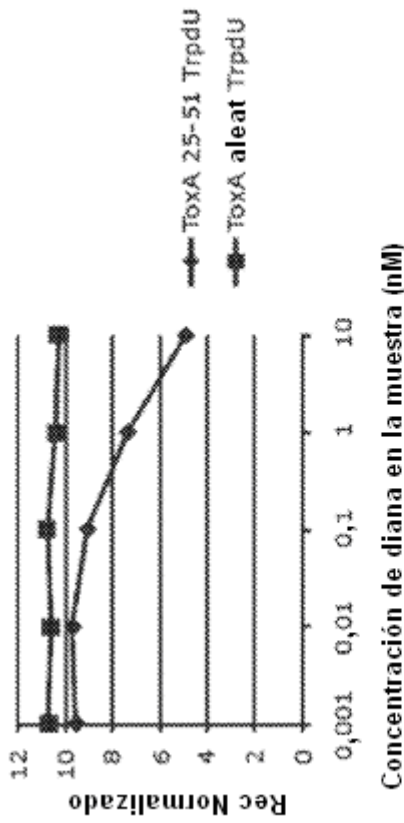


FIG. 3B

Detección de Toxina B: cPCR del eluato de la Toma 2



Detección de Toxina A: cPCR del eluato de la Toma 2



Curvas patrón de cPCR

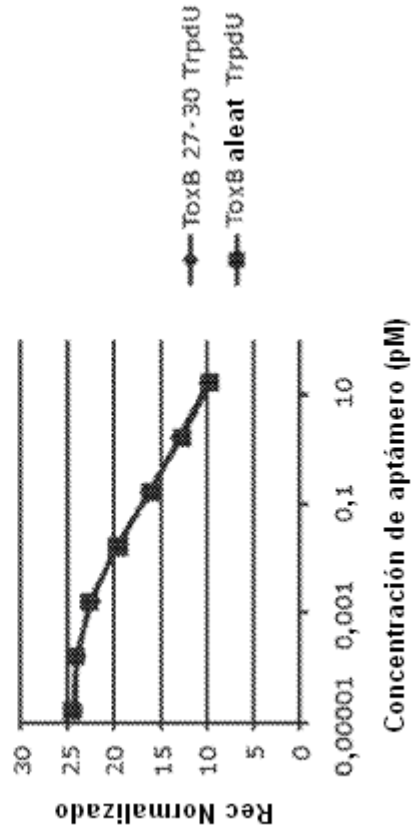


FIG. 4B

Curvas patrón de cPCR

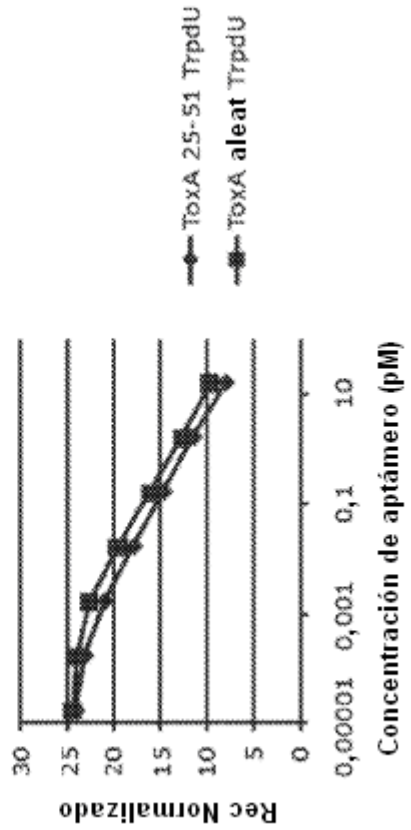


FIG. 4A

**Ensayo de Sándwich en Placa para Toxina A con respecto a Toxina B:
Captura con aptámeros de ToxA, detección con ToxA/B de mAb**

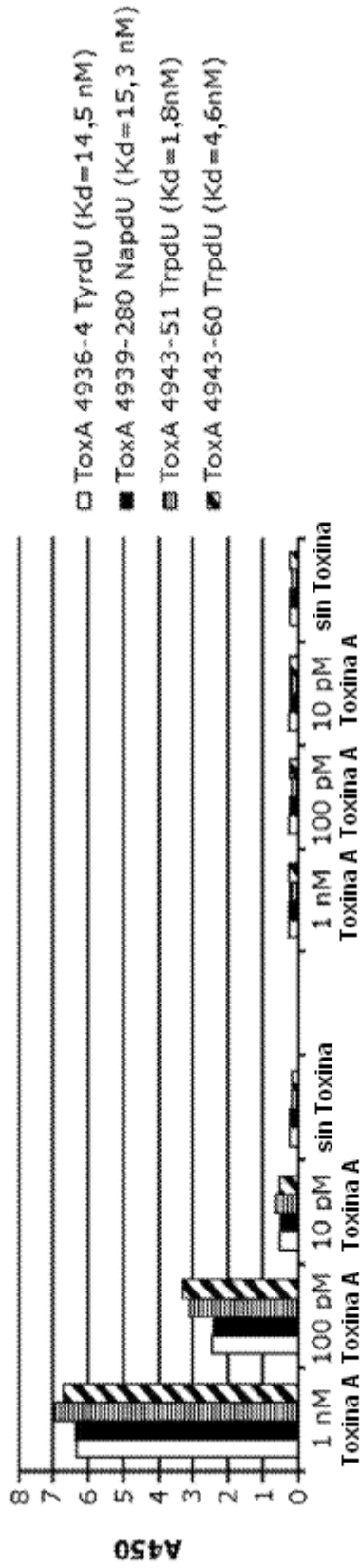


FIG. 5A

**Ensayo de Sándwich en Placa para Toxina A con respecto a Toxina B:
Captura con aptámeros de ToxB, detección con ToxA/B de mAb**

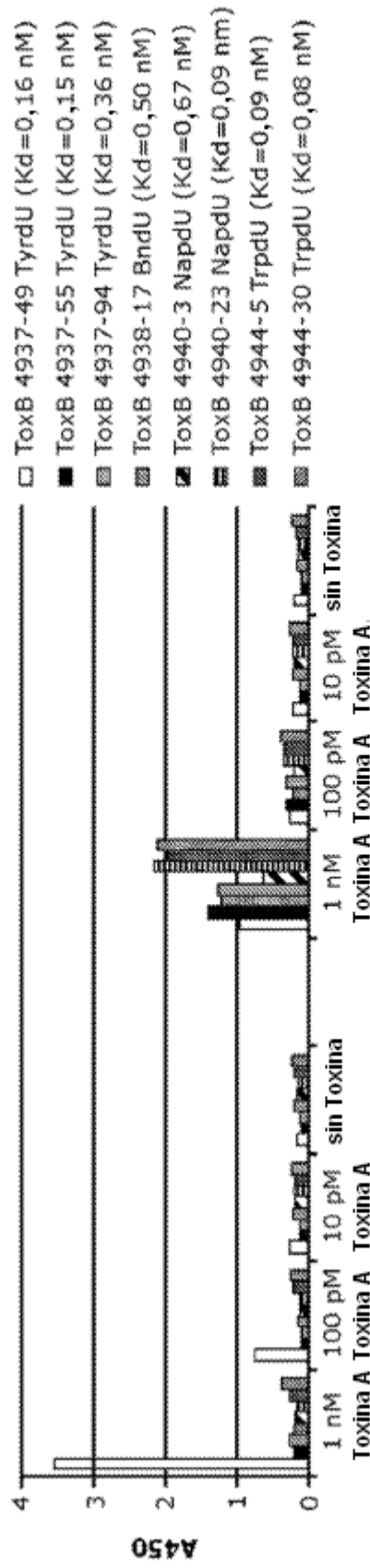


FIG. 5B

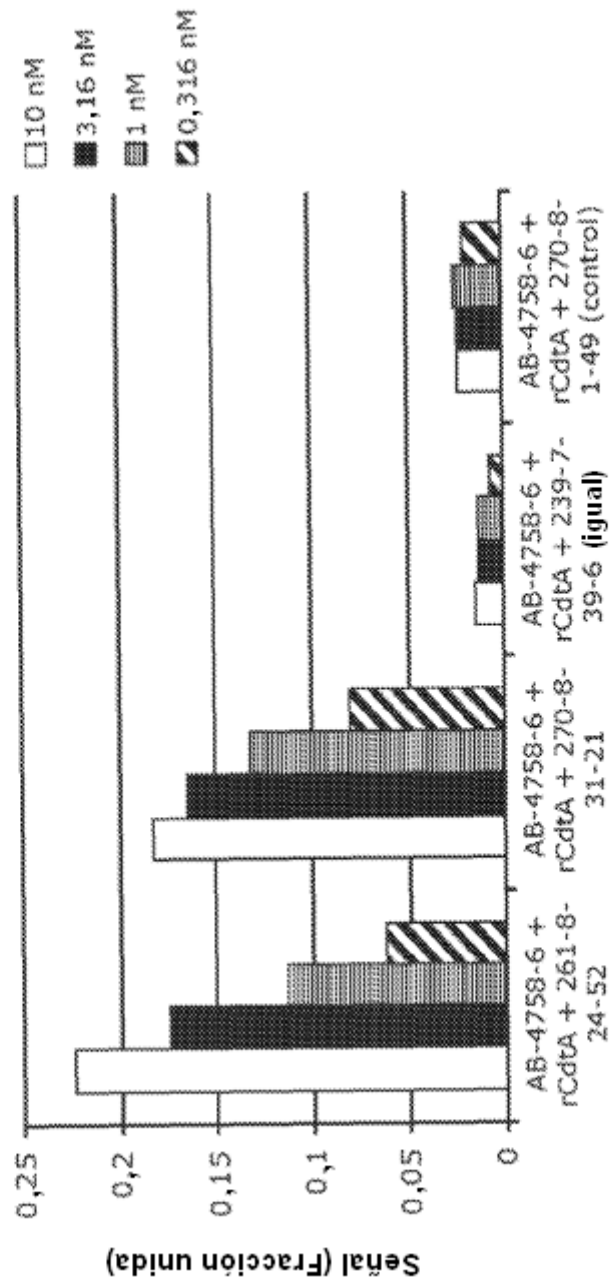
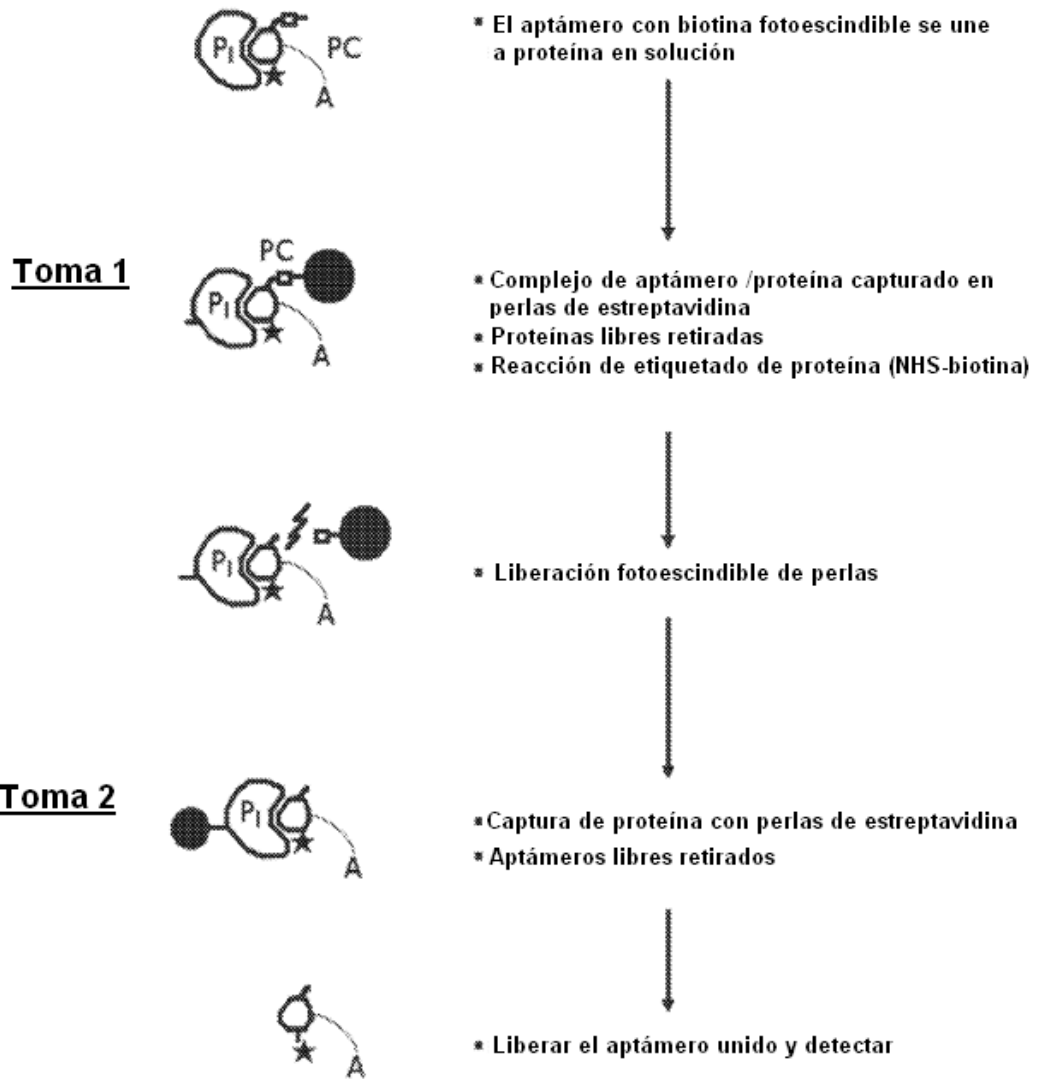
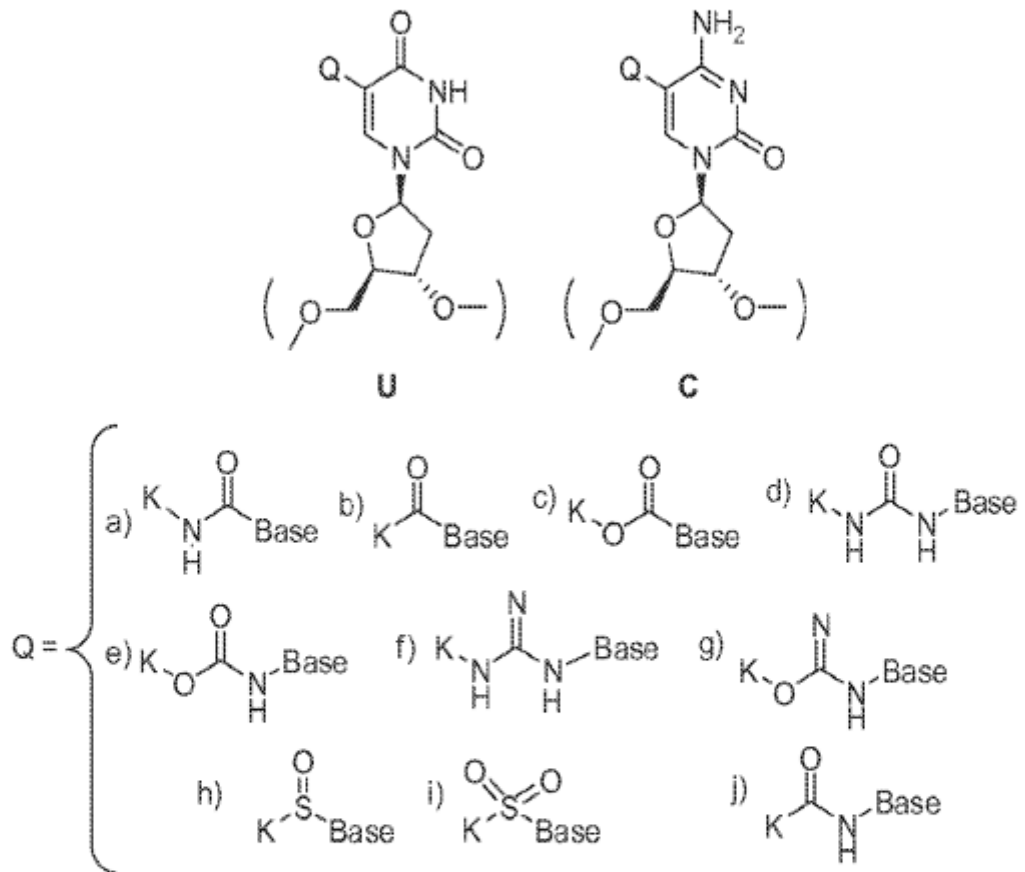


FIG. 7





Base = Uridina (U) o Citidina (C) (la unión es en la posición 5)

K = grupo R' más grupo conector $(\text{CH}_2)_n$, en el que $n = 0-3$

FIG. 9

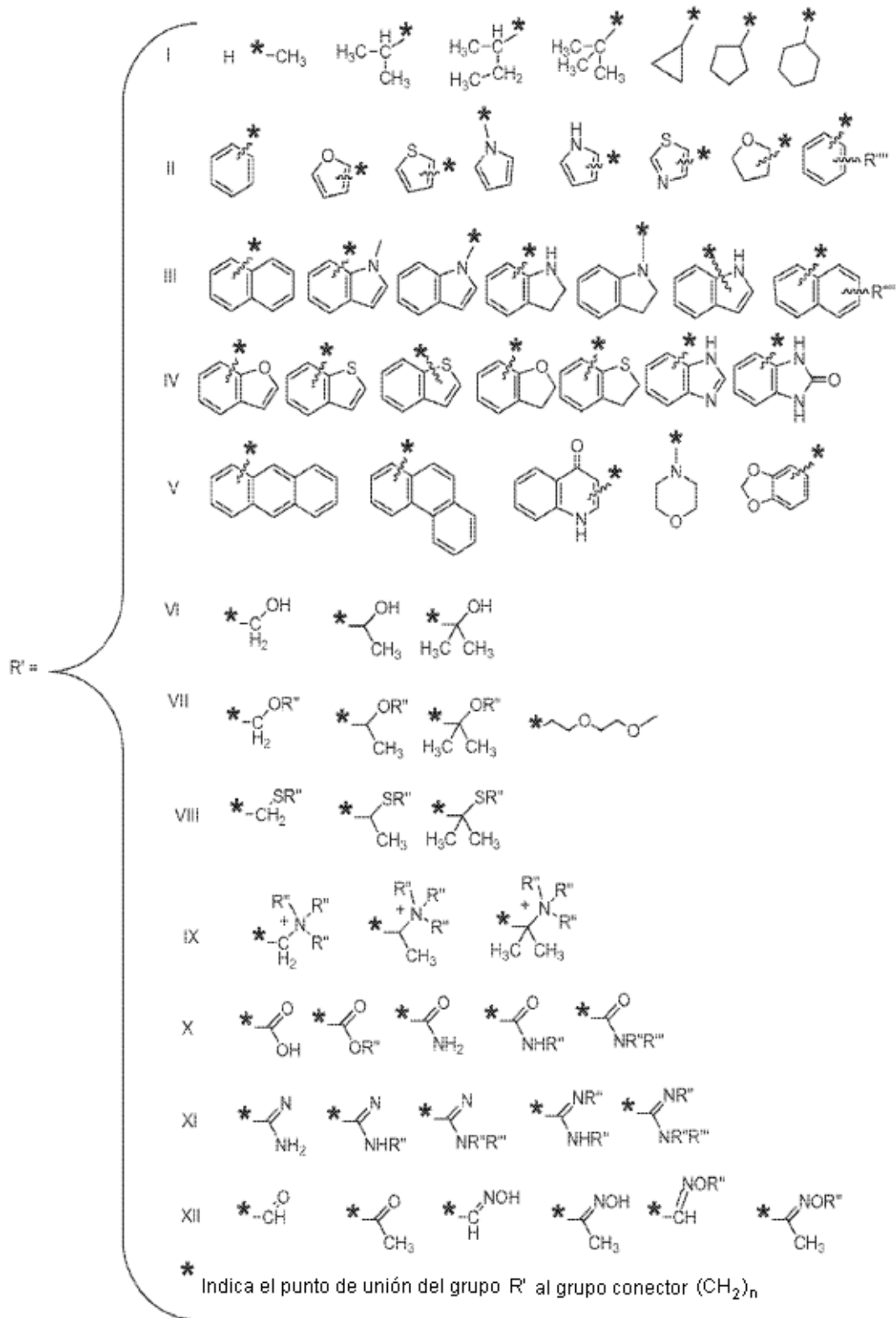


FIG. 9 continuación

en los que

R^{'''} se selecciona entre el grupo que consiste en un alquilo (C1-C20) inferior lineal o ramificado; hidroxilo (OH), halógeno (F, Cl, Br, I); nitrilo (CN); ácido borónico (BO₂H₂); ácido carboxílico (COOH); éster de ácido carboxílico (COOR^{''}); amida primaria (CONH₂); amida secundaria (CONHR^{''}); amida terciaria (CONR^{''}R^{''}); sulfonamida (SO₂NH₂); N-alquilsulfonamida (SONHR^{''});

en los que

R^{''}, R^{'''} se seleccionan independientemente entre un grupo que consiste en un alquilo (C1-C20) inferior lineal o ramificado; fenilo (C₆H₅); un anillo de fenilo sustituido con R^{''''} (R^{''''}C₆H₄); en el que R^{''''} se ha definido anteriormente; un ácido carboxílico (COOH); un éster de ácido carboxílico (COOR^{''''}); en el que R^{''''} es un alquilo (C1-C20) inferior lineal o ramificado; y cicloalquilo; en el que R^{''} = R^{'''} = (CH₂)_n;

en el que n = 2-10.

FIG. 9 continuación