



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 289**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05857499 .7**

96 Fecha de presentación : **01.07.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1766012**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

54 Título: **Método y compuesto antibacteriano antisentido.**

30 Prioridad: **02.07.2004 US 585112 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.11.2011**

73 Titular/es: **AVI BIOPHARMA, Inc.**  
**Suite 200, 4575 S.W. Research Way**  
**Corvallis, Oregón 97333, US**

72 Inventor/es: **Geller, Bruce, L.;**  
**Deere, Jesse D. y**  
**Iversen, Patrick, L.**

74 Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 367 289 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**

Método y compuesto antibacteriano antisentido

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a compuestos de oligonucleótidos que son antisentido para genes de bacteria y a métodos para usar dichos compuestos en la inhibición del crecimiento bacteriano, por ejemplo en un sujeto mamífero infectado, tal como se caracteriza en las reivindicaciones.

**Referencias**

- Blommers, M. J., y col., *Nucleic Acids Res* 22(20): 4187-94, (1994).
- Bramhill, D., *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 395-424.
- 10 Cross, C. W., y col., *Biochemistry* 36(14): 4096-107, (1997).
- Donachie, W. D., *Annu Rev Microbiol* 47: 199-230, (1993).
- Dryselius, R., y col., *Oligonucleotides* 13(6): 427-33, (2003).
- Frimodt-Moller, N., J., y col., *HANDBOOK OF ANIMAL MODELS OF INFECTION.*, San Diego, CA, Academic Press, (1999).
- 15 Gait, M. J., y col., *J Chem Soc [Perkin 1]* 0(14): 1684-6, (1974).
- Galloway, S. M. y Raetz, C.R., *J Biol Chem* 265(11): 6394-402, (1990).
- Geller, B. L., y col., *Antimicrob Agents Chemother* 47(10): 3233-9, (2003).
- Geller, B. L. y Green, H.M., *J Biol Chem* 264(28): 16465-9, (1989).
- Gerdes, S. Y., y col., *J Bacteriol* 185(19): 5673-84, (2003).
- 20 Good, L., y col., *Nat Biotechnol* 19(4): 360-4, (2001).
- Good, L., y col., *Microbiology* 146 (Pt 10): 2665-70, (2000).
- Hale, C. A. y de Boer, P.A., *J Bacteriol* 181(1): 167-76, (1999).
- Jackowski, S. y Rock, C.O., *J Biol Chem* 258(24): 15186-91, (1983).
- Jackson, y col., *Epidemiol. Infect* 120(1): 17-20, (1998).
- 25 Knudsen, H. y Nielsen, P.E., *Nucleic Acids Res* 24(3): 494-500, (1996).
- Lesnikowski, Z. J., y col., *Nucleic Acids Res* 18(8): 2109-15, (1990).
- Lutkenhaus, J. y Addinall, S.G., *Annu Rev Biochem* 66: 93-116, (1997).
- Mertes, M. P. y Coats, E.A., *J Med Chem* 12(1): 154-7, (1969).
- Miyada, C.G. y Wallace, R.B., *Methods Enzymol.* 154: 94-107, (1987).
- 30 Nielsen, P. E., *Pharmacol Toxicol* 86(1): 3-7, (2000).
- Nikaido, H., *J Bioenerg Biomembr* 25(6):581-9, (1993).
- Partridge, M., y col., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6(3): 169-75, (1996).
- Polacco, M. L. y Cronan, Jr., J.E., *J Biol Chem* 256(11): 5750-4, (1981).
- Rahman, M. A., y col., *Antisense Res Dev* 1(4): 319-27, (1991).
- 35 Stein, D., y col., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(3): 151-7, (1997).
- Summerton, J., *Biochim Biophys Acta* 1489(1): 141-58, (1999).

Summerton, J., y col., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(2): 63-70, (1997).

Summerton, J. y Weller, D., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(3): 187-95, (1997).

Zhang, Y. y Cronan, Jr., J.E., *J Bacteriol* 178(12): 3614-20, (1996).

Zuker, M., *Nucleic Acids Res* 31(13): 3406-15, (2003).

## 5 **Antecedentes de la invención**

10 Actualmente existen varios tipos de compuestos antibióticos que se usan contra patógenos bacterianos, y estos compuestos actúan a través de una serie de mecanismos antibacterianos. Por ejemplo, los antibióticos de beta-lactama, tales como la penicilina y la cefalosporina, actúan para inhibir la etapa final de la síntesis de peptidoglicanos. Los antibióticos de glicopéptidos, que incluyen la vancomicina y la teicoplanina, inhiben tanto la transglicosilación como la transpeptidación de muramil-pentapéptido, interfiriendo de nuevo en la síntesis de peptidoglicanos. Otros antibióticos bien conocidos incluyen las quinolonas, que inhiben la replicación de ADN bacteriano, los inhibidores de ARN polimerasa bacteriana, tales como rifampina, y los inhibidores de enzimas del mecanismo de producción de tetrahidrofolato, que incluyen las sulfonamidas.

15 Algunas clases de antibióticos actúan a nivel de síntesis de proteínas. Ejemplos destacables de los mismos son los aminoglicósidos, tales como la canamicina y la gentamicina. Esta clase de compuestos actúa sobre la subunidad de ribosoma 30S bacteriana, previniendo la asociación con la subunidad 50S para formar ribosomas funcionales. Las tetraciclinas, otra clase importante de antibióticos, también actúan sobre la subunidad de ribosoma 30S, previniendo el alineamiento de ARNt's aminoacilados con el correspondiente codón de ARNm. Las macrolidas y las lincosamidas, otra clase de antibióticos, inhiben la síntesis bacteriana uniéndose a la subunidad de ribosoma 50S, e inhibiendo la elongación de péptidos o previniendo la traslocalización de ribosomas.

25 A pesar de los logros impresionantes obtenidos en el control o en la eliminación de infecciones bacterianas mediante antibióticos, el uso extendido de antibióticos tanto en medicina humana como en suplemento de piensos para aves de corral y producción de animales vivos ha generado resistencia a fármaco en muchas bacterias patógenas. Los mecanismos de resistencia a antibióticos pueden adoptar diversas formas. Uno de los principales mecanismos de resistencia a beta lactamas, particularmente en bacterias Gram negativas, es la enzima beta-lactamasa, que hace que el antibiótico sea inactivo. Asimismo, la resistencia a aminoglicósidos a menudo implica una enzima capaz de desactivar el antibiótico, en este caso añadiendo un grupo fosforilo, adenilo o acetilo. El eflujo activo de antibióticos es otra forma en la que muchas bacterias desarrollan resistencia. Se han identificado los genes que codifican las proteínas de eflujo, tales como los genes tetA, tetG, tetL y tetK, para el eflujo de tetraciclina. Una diana bacteriana puede desarrollar resistencia alterando la diana del fármaco. Por ejemplo, las denominadas proteínas de unión a penicilina (PBPs, del inglés "penicillin binding proteins") en muchas bacterias resistentes a beta-lactama son alteradas para inhibir la unión crítica del antibiótico a la proteína objetivo. La resistencia a tetraciclina puede implicar, además de un aumento del eflujo, la aparición de proteínas citoplásmicas capaces de competir con ribosomas por la unión al antibiótico. Para los antibióticos que actúan mediante la inhibición de una enzima bacteriana, tal como las sulfonamidas, mutaciones puntuales en la enzima diana pueden conferir resistencia.

40 La aparición de resistencia a antibióticos en muchas bacterias patógenas (que en muchos casos implica resistencia multi-fármaco) ha extendido la sombra de una era pre-antibiótica en la que muchos patógenos bacterianos simplemente no pueden ser tratados mediante intervención médica. Existen dos factores principales que podrían contribuir a dicho escenario. El primero es la rápida extensión de la resistencia y de genes multi-resistencia a lo largo de cepas, especies y géneros bacterianos, mediante elementos conjugativos, siendo el más importante los plásmidos auto-transmisibles. El segundo factor es una falta de esfuerzos investigativos en la actualidad para descubrir nuevos tipos de antibióticos, debido en parte a la percepción de inversión en tiempo y dinero necesaria para descubrir nuevos agentes antibióticos y llevarlos a ensayos clínicos, un proceso que puede requerir un esfuerzo investigador de 20 años en algunos casos.

45 Para afrontar el segundo de estos factores, se han propuesto algunas estrategias de descubrimiento de fármacos que pueden acelerar la investigación de nuevos antibióticos. Por ejemplo, se han presentado esfuerzos para escrutar e identificar nuevos compuestos antibióticos mediante escrutinio de alta capacidad, pero hasta la fecha no se han descubierto compuestos importantes mediante esta ruta.

50 Se han propuesto varias estrategias que implican agentes antisentido diseñados para bloquear la expresión de genes de resistencia bacterianos o para actuar sobre dianas de ARN celular, tales como el ARNr en la subunidad de ribosoma 30S (Rahman, Summerton y col. 1991; Good y Nielsen, 1998). En general, estas estrategias solo han tenido éxito en un número limitado de casos, o han requerido concentraciones elevadas de antisentido (por ejemplo, Summerton, Stein y col., 1997), o el requisito de que las células tratadas muestren una alta permeabilidad para antibióticos (Good y Nielsen, 1998; Geller, Deere y col., 2003).

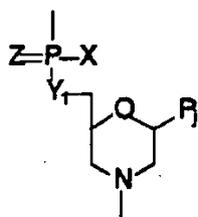
5 Por lo tanto, existe una creciente necesidad por obtener nuevos antibióticos que (i) no estén sujetos a los principales tipos de resistencia a antibióticos que dificultan hoy día el tratamiento con antibióticos de bacterias, (ii) puedan desarrollarse rápidamente y con un grado razonable de predictibilidad tal como especificidad de bacteria diana, (iii) también puedan ser diseñados para una actividad de amplio espectro, (iv) sean efectivos en dosis bajas, lo que significa, en parte, que sean captados eficientemente por bacterias naturales o incluso por bacterias que tengan una baja permeabilidad a antibióticos, y (v) muestren pocos efectos secundarios.

### Resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

10 La invención incluye, en un aspecto general, un compuesto de oligonucleótido antisentido sustancialmente no cargado para inhibir el crecimiento de células bacterianas patógenas, y que tiene (i) no más de 12 bases de nucleótido, (ii) una secuencia de ácido nucleico de no menos de 10 bases de longitud dirigida contra un ARNm bacteriano que codifica una proteína de *acpP*, en la que dicha secuencia de ácido nucleico dirigida es complementaria a una secuencia dirigida que contiene el codón de inicio de la traducción de dicho ARNm bacteriano o a una secuencia dirigida que contiene 20 bases en la dirección 3' del codón de inicio de la traducción de dicho ARNm bacteriano; y (iii) una  $T_m$ , cuando se hibrida con la secuencia dirigida, entre 50°C y 65°C.

15 Dicho compuesto de oligonucleótido mencionado anteriormente está compuesto de subunidades de morfolino y enlaces intersubunidades que contienen fósforo que unen un nitrógeno de morfolino de una subunidad con un carbono exocíclico 5' de una subunidad adyacente. Las subunidades de morfolino pueden estar unidas por enlaces de fosfordiamidato, de acuerdo con la estructura:



20 en la que  $Y_1 = O$ ,  $Z = O$ ,  $P_j$  es un resto de par base de purina o pirimidina que se une de forma eficaz, a través de un enlace de hidrógeno específico de base, a una base de un polinucleótido, y  $X$  es alquilo, alcoxi, tioalcoxi, amino o alquil amino, que incluye dialquilamino.

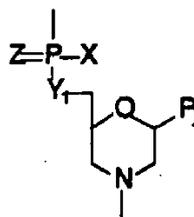
25 El compuesto de oligonucleótido puede contener solo 10, o solo 11 bases, y su secuencia de ácido nucleico puede ser completamente complementaria a la secuencia de ARNm dirigida.

Para su uso en la inhibición de una infección bacteriana en un sujeto mamífero, el compuesto debe administrarse en una cantidad terapéuticamente efectiva, y el tratamiento también puede incluir el tratamiento del sujeto con otro compuesto anti-sentido o no anti-sentido que tenga actividad antibacteriana.

30 En otro aspecto, la invención incluye un compuesto antibacteriano para su uso como medicamento que consta de un compuesto de oligonucleótido antisentido sustancialmente no cargado que tiene (i) no más de 12 bases de nucleótidos, (ii) una secuencia de ácido nucleico de no menos de 10 bases de longitud dirigida contra un ARNm bacteriano que codifica una proteína de *acpP*, en la que dicha secuencia de ácido nucleico dirigida es complementaria a una secuencia dirigida que contiene el codón de inicio de la traducción de dicho ARNm bacteriano o a una secuencia dirigida que contiene 20 bases en la dirección 3' del codón de inicio de la traducción de dicho ARNm bacteriano; y (iii) una  $T_m$ , cuando se hibrida con la secuencia dirigida, entre 50°C y 65°C.

35 El compuesto está dirigido contra un ARNm bacteriano que codifica la proteína *acpP* y la secuencia dirigida del compuesto puede ser complementaria a al menos diez bases contiguas de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 2, 5, 8, 11 y 14.

40 El compuesto consta de subunidades de morfolino y enlaces intersubunidades que contienen fósforo que unen un nitrógeno de morfolino de una subunidad a un carbono exocíclico 5' de otra subunidad adyacente. Las subunidades de morfolino pueden estar unidas mediante enlaces de fosfordiamidato, de acuerdo con la estructura:



en la que  $Y_1 = O$ ,  $Z = O$ ,  $P_j$  es un resto de par base de purina o pirimidina que se une de forma eficaz, a través de un enlace de hidrógeno específico de base, a una base de un polinucleótido, y  $X$  es alquilo, alcoxi, tioalcoxi, amino o alquil amino, que incluye dialquilamino.

- 5 El compuesto puede contener solo 10 ó solo 11 bases, y su secuencia de ácido nucleico puede ser completamente complementaria a la secuencia diana de ARNm.

Estos y otros objetivos y características de la invención serán completamente evidentes a través de la siguiente descripción detallada de la invención, leída en combinación con las figuras anexas.

#### **Breve descripción de las figuras**

- 10 Las Figuras 1A-D muestran varias subunidades de tipo morfolino preferidas que presentan grupos de unión de 5 átomos (A), seis átomos (B) y siete átomos (C-D), adecuadas para formar polímeros.

Las Figuras 2A-D muestran el segmento de subunidad que se repite de ejemplos de oligonucleótidos de morfolino, designados de A a D, construidos usando las subunidades A-D, respectivamente, de la Figura 1.

- 15 Las Figuras 3A-3G muestran ejemplos de tipos de enlaces no cargados en análogos de oligonucleótidos y la Figura 3H muestra un ejemplo de un tipo de enlace catiónico.

La Figura 4 muestra el efecto de la longitud antisentido sobre la expresión de *myc*-luciferasa en *E. coli* SM101. La actividad de luciferasa se midió en cultivos de *E. coli* SM101 (pSE380*myc-luc*) cultivados con diversas longitudes de PMO solapantes (20  $\mu$ M) dirigido contra la región en torno al codón de inicio de *myc-luc*. Las barras a rayas indican PMO truncado en el extremo 3' y las barras sólidas son PMO truncados en el extremo 5'.

- 20 La Figura 5 muestra el efecto de la longitud de antisentido sobre la expresión de *myc*-luciferasa en reacciones de traducción libres de células bacterianas. Se añadieron individualmente (100 nM) los mismos PMO usados para los estudios mostrados en la Figura 4 a reacciones de síntesis de proteínas libres de células bacterianas programadas para fabricar *myc-luc*. Las barras a rayas muestran PMO truncados en 3' y las barras rellenas muestran PMO truncados en 5'.

- 25 La Figura 6 muestra el efecto de la posición antisentido cerca del codón de inicio. Se añadieron (100 nM) PMO solapantes isométricos (10 bases) complementarios a la región en torno al codón de inicio del gen indicador *myc-luc* a reacciones de traducción libres de células bacterianas programadas para fabricar *myc-luc*. El número de identificación de PMO (Tabla 4) se muestra debajo de cada barra.

- 30 La Figura 7 muestra el efecto de la posición antisentido en dirección 5' y 3' respecto del codón de inicio de *myc-luc*. Se añadieron (200 nM) PMO complementarios a las diversas regiones a lo largo del transcrito *myc-luc* a reacciones de traducción libres de células bacterianas programadas para fabricar *myc-luc*. La posición lateral de cada PMO a lo largo del eje X indica su posición complementaria en el transcrito de *myc-luc*. La posición vertical de cada línea de PMO indica el porcentaje de inhibición relativo a una reacción de control sin PMO.

- 35 Las Figuras 8A y 8B son análisis de correlación que comparan (8A) la inhibición de luciferasa en reacciones libres de células con la 2ª puntuación de PMO, y (8B) el mismo análisis con todos los PMO de 10 bases dirigidos a *myc-luc*.

- 40 Las Figuras 9A y 9B muestran el efecto de la longitud antisentido *AcpP* sobre el crecimiento de *E. coli* AS19. Los cultivos de *E. coli* AS19 fueron cultivados (37°C) con varias longitudes (de 6 a 20 bases) de PMO solapantes (20  $\mu$ M) dirigidos a la región en torno al codón de inicio del gen *acpP* de *E. coli* (Tabla 1, SEC ID N°: 2). Se monitorizó la densidad óptica (DO) con el tiempo (Figura 9A) y los cuadrados huecos indican el cultivo con el PMO de 11 bases 169 (SEC ID N°: 109) y las células viables medidas después de 8 horas (Figura 9B).

La Figura 11 muestra el efecto de longitud antisentido sobre la expresión de gen indicador en células HeLa. Se cargaron (10  $\mu$ M) los PMO de *Myc* 340 (11 bases, barras huecas, SEC ID N°: 63), 126 (20 bases, barras tachadas, SEC ID N°: 71) ó 143 (control de secuencia sin sentido de 20 bases, barras rellenas, SEC ID N°: 102) por separado en células HeLa que habían sido transfectadas con un plásmido de expresión de *myc-luc*.

La Figura 12 muestra la traducción libre de células de reticulocitos de conejo con antisentido de diversas longitudes. El mismo PMO truncado en 3' usado en los experimentos mostrados en la Figura 1 se añadió individualmente (100 nM) a reacciones de traducción libres de células compuestas por lisato de reticulocitos de conejo y programado para fabricar *myc-luc*.

- 5 La Figura 13 muestra CFU/mL en lavados peritoneales de ratones infectados con la cepa AS19 de *E. coli* y tratadas con PMO de *acpP* (■), PMO no sentido (▲) o PBS (▼) a 0 h. A cada tiempo indicado, se recolectó el lavado peritoneal y se analizó para determinar bacterias (CFU/mL) de 3 ratones en cada grupo de tratamiento.

La Figura 14 muestra CFU/mL en lavados peritoneales de ratones infectados con la cepa SM105 de *E. coli* y tratados con PMO, como se ha descrito en la Figura 13.

## 10 Descripción detallada de la invención

### I. Definiciones

Los términos mostrados a continuación, tal como se usan en la presente memoria, tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario:

- 15 Tal como se usan en la presente memoria, los términos “compuesto”, “agente”, “oligómero” y “oligonucleótido” pueden usarse de forma intercambiable con respecto a los oligonucleótidos antisentido o análogos de oligonucleótidos de la invención.

20 Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones “oligonucleótido antisentido” y “oligómero antisentido” o “compuesto antisentido” o “compuesto oligomérico antisentido” se usan de forma intercambiable y se refieren a una secuencia de subunidades que tienen todas una base en la subunidad de cadena principal compuesta por ribosa u otros azúcares de pentosa o un grupo morfolino, y donde los grupos de la cadena principal están ligados mediante enlaces de intersubunidades (la mayoría de los cuales, o todos, son no cargados) que permiten que las bases del compuesto se hibriden con una secuencia diana en un ARN mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick, para formar un heterodúplex ARN:oligómero dentro de la secuencia diana. El oligómero puede tener una complementariedad de secuencia exacta con la secuencia diana, o cerca de la complementariedad total. Dichos oligómeros antisentido se diseñan para bloquear o inhibir la traducción del ARNm que contiene la secuencia diana, y se puede decir que están “dirigidos a” una secuencia con la cual se hibridan. Los ejemplos de estructuras de oligonucleótidos antisentido para su uso en la invención incluyen los tipos de subunidad de  $\beta$ -morfolino mostrados en las Figuras 1A-D. Cabe destacar que un polímero puede contener más de un tipo de enlace.

30 Tal como se usan en la presente memoria, “compuesto de oligonucleótido antisentido” o “compuesto antisentido” o “compuesto de oligonucleótido” se refieren a un “oligonucleótidos antisentido” o a un “oligómero antisentido”, o “compuesto de oligonucleótido” o “análogo de oligonucleótido”, que también puede incluir uno o más restos adicionales conjugados al oligómero, por ejemplo, en su extremo 3' ó 5', tal como un resto de polietilenglicol u otro polímero hidrofílico, por ejemplo uno que tenga 10-100 subunidades monoméricas, que pueden ser útiles para potenciar la solubilidad, o un resto tal como un resto lipídico o peptídico que sea eficaz para potenciar la captación del compuesto en células bacterianas diana y/o potenciar la actividad del compuesto dentro de la célula, por ejemplo potenciar su unión a un polinucleótido diana.

La subunidad A de la Figura 1 contiene un enlace con un átomo de fósforo que forma la cadena principal de unidad que se repite de cinco átomos mostrada como A en la Figura 2, en donde los anillos morfolino están ligados mediante un enlace de fosfonamida de 1 átomo.

40 La subunidad B de la Figura 1 está diseñada para cadenas principales de unidades que se repiten de 6 átomos, tal como se muestra en B en la Figura 2. En la estructura B de la Figura 1 el átomo Y que une el carbono 5' del morfolino con el grupo fosforoso puede ser azufre, nitrógeno, carbono o, preferiblemente, oxígeno. El resto X que cuelga del fósforo puede ser cualquiera de los siguientes: flúor; un alquilo o alquilo sustituido; un alcoxi o alcoxi sustituido; un tioalquilo o tioalquilo sustituido; o nitrógeno monosustituido, disustituido o no sustituido, incluyendo estructuras cíclicas.

45 Las subunidades C-D de la Figura 1 están diseñadas para cadenas principales de unidades de 7 átomos de longitud como se muestra para C y D en la Figura 2. En la Estructura C de la Figura 1, el resto X es como en la Estructura B de la Figura 1 y el resto Y puede ser un metileno, un azufre, o preferiblemente un oxígeno. En la Estructura D de la Figura 1, los restos X e Y son como en la Estructura B de la Figura 1. En todas las subunidades mostradas en las Figuras 1A-D, Z es O ó S, y P<sub>i</sub> o P<sub>j</sub> es adenina, citosina, guanina o uracilo.

50 Tal como se usa en la presente memoria, un “oligómero de morfolino” se refiere a una molécula polimérica que tiene una cadena principal que soporta bases capaces de unirse mediante enlace de hidrógeno a polinucleótidos típicos, en donde el polímero carece de un resto de cadena principal de azúcar tipo pentosa, y más específicamente una

- cadena principal de ribosa ligada mediante enlaces de fosfodiéster que es típica de nucleótidos y nucleósidos, y en su lugar contiene un anillo de nitrógeno con acoplamiento a través del nitrógeno del anillo. Un oligonucleótido de "morfolino" preferido está compuesto de estructuras de subunidades de morfolino de la forma mostrada en la Figura 2B, en donde (i) las estructuras están unidas mediante enlaces que contienen fósforo, de uno a tres átomos de longitud, que unen el nitrógeno del morfolino de una subunidad con el carbono exocíclico 5' de otra subunidad adyacente, y (ii) P<sub>i</sub> y P<sub>j</sub> son restos de pares base de purina o pirimidina que son eficaces en la unión, mediante enlace de hidrógeno específico de base, a una base en un polinucleótido.
- Este aspecto preferido de la invención se ilustra en la Figura 2B, que muestra dos de dichas subunidades unidas por un enlace de fosforodiamidato. Los oligonucleótidos de morfolino (que incluyen oligómeros antisentido) se detallan, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. de propiedad compartida 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.185.444, 5.521.063 y 5.506.337, todas las cuales se incorporan de manera expresa a modo de referencia a la presente memoria.
- Tal como se usa en la presente memoria, una molécula oligomérica (oligómero) "resistente a nucleasa" es aquella cuya cadena principal no es susceptible de ruptura por nucleasa de un enlace fosfodiéster. Los ejemplos de oligómeros antisentido resistentes a nucleasa son análogos de oligonucleótidos, tales como fosforotioato y fosfato-amina ADN (pnADN), los cuales tienen ambos una cadena principal cargada, y metil-fosfonato, y oligonucleótidos de morfolino, todos los cuales presentan cadenas principales no cargadas.
- Tal como se usa en la presente memoria, un oligonucleótido u oligómero antisentido "se hibrida específicamente" con un polinucleótido diana si el oligómero se hibrida a la diana en condiciones fisiológicas, con una T<sub>m</sub> superior a 37°C. Como se verá más adelante, los compuestos oligoméricos de la presente invención presentan valores de T<sub>m</sub> con respecto a sus ARNms diana de entre 50°C y 60°C.
- La "T<sub>m</sub>" de un compuesto de oligonucleótido, con respecto a su ARNm diana, es la temperatura a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida con un polinucleótido complementario. La T<sub>m</sub> se determina en condiciones estándar en suero fisiológico, tal como se describe, por ejemplo, en Miyada C.G. y Wallace R.B., 1987.
- Los polinucleótidos se describen como "complementarios" uno a otro cuando se produce la hibridación en una configuración antiparalela entre dos polinucleótidos de cadena sencilla. Un polinucleótido de cadena doble puede ser "complementario" a otro polinucleótido si la hibridación puede producirse entre una de las cadenas del primer polinucleótido y el segundo. La complementariedad (el grado en que un polinucleótido es complementario con otro) es cuantificable en términos de la proporción de bases en cadenas opuestas que se espera formen enlaces de hidrógeno unas con otras, de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases aceptadas generalmente.
- Tal como se usa en la presente memoria, el término "análogo" en referencia a un oligómero significa una sustancia que posee propiedades tanto estructurales como químicas que son similares a las de un oligómero de referencia.
- Tal como se usa en la presente memoria, una primera secuencia es una "secuencia antisentido" con respecto a una segunda secuencia si un polinucleótido cuya secuencia es la primera secuencia se une específicamente, o se hibrida específicamente, a la segunda secuencia de polinucleótido en condiciones fisiológicas.
- Tal como se usa en la presente memoria, un "evento de unión intracelular específico de base que implica un ARN diana" se refiere a la unión específica de secuencia de un oligómero con una secuencia de ARN diana en el interior de una célula. Por ejemplo, un polinucleótido de cadena sencilla puede unirse específicamente a un polinucleótido de cadena sencilla que es complementario en secuencia.
- Tal como se usa en la presente memoria, "heterodúplex resistente a nucleasa" se refiere a un heterodúplex formado mediante la unión de un oligómero antisentido a su diana complementaria, que es resistente a la degradación *in vivo* por efecto de nucleasas ubicuas intracelulares y extracelulares.
- Tal como se usa en la presente memoria, "genes bacterianos esenciales" son aquellos genes cuyos productos desempeñan un papel esencial en el repertorio funcional de un organismo, determinado usando la huella genética u otras técnicas comparables para identificar la esencialidad génica.
- Un agente es "captado activamente por células bacterianas" cuando el agente pueden entrar en la célula mediante un mecanismo diferente a la difusión pasiva a través de la membrana celular. El agente puede ser transportado, por ejemplo, mediante "transporte activo", que se refiere al transporte de agentes a través de una membrana celular de mamífero mediante, por ejemplo, un mecanismo de transporte dependiente de ATP, o mediante "transporte facilitado", que se refiere al transporte de agentes antisentido a través de la membrana celular mediante un mecanismo de transporte que requiere la unión del agente a una proteína de transporte, que a continuación facilita el paso del agente ligado a través de la membrana. Para ambos transportes, activo y facilitado, el compuesto de oligonucleótido preferiblemente tiene una cadena principal sustancialmente no cargada, tal como se define más adelante.

5 Tal como se usa en la presente memoria, los términos “expresión moduladora” y “actividad antisentido” en relación a un oligonucleótido se refieren a la capacidad de un oligonucleótido antisentido (oligómero) para potenciar o reducir la expresión de una proteína dada interfiriendo con la expresión o la traducción de ARN. En el caso de una expresión proteica reducida, el oligómero antisentido puede bloquear directamente la expresión de un gen dado, o contribuir a la degradación acelerada del ARN transcrito a partir de dicho gen.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “inhibición del crecimiento bacteriano” se refiere a bloquear o inhibir la replicación y/o reducir la velocidad de replicación de células bacterianas en un entorno dado, por ejemplo, en un hospedante mamífero infectado.

10 Tal como se usa en la presente memoria, los términos “bacteria patógena” o “bacterias patógenas” o “células bacterianas patógenas” se refieren a células bacterianas capaces de infectar un hospedante mamífero y de producir síntomas relacionados con la infección en el hospedante infectado, tales como fiebre u otros signos de inflamación, síntomas intestinales, síntomas respiratorios, deshidratación, y otros similares.

15 Tal como se usan en la presente memoria, “cantidad efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva” o “cantidad que inhibe el crecimiento” en relación a un oligómero antisentido se refieren a la cantidad de oligómero antisentido administrado a un sujeto mamífero, bien en una única dosis o bien como parte de una serie de dosis, y que es efectiva para inhibir la replicación bacteriana en un hospedante infectado, inhibiendo la traducción de una secuencia de ácido nucleico diana bacteriana seleccionada. La capacidad para bloquear o inhibir la replicación bacteriana en un hospedante infectado puede ser una evidencia de una reducción de los síntomas relacionados con la infección.

20 Tal como se usa en la presente memoria, “tratamiento” de un individuo o de una célula es cualquier tipo de intervención usada en un intento de alterar el curso natural del individuo o célula. El tratamiento incluye, aunque sin limitación, la administración de, por ejemplo, una composición farmacéutica, y puede llevarse a cabo profilácticamente o después del inicio de un evento patológico o de un contacto con un agente etiológico.

## II. Ejemplos de cadenas principales de oligómeros

25 Los ejemplos de enlaces no iónicos que pueden usarse en los análogos de oligonucleótidos se muestran en las Figuras 3A-3G. En estas figuras, B representa un resto de par base de purina o pirimidina que es eficaz para unirse, mediante enlace de hidrógeno específico de base, a una base de un polinucleótido, preferiblemente seleccionada entre adenina, citosina, guanina, timidina, uracilo e inosina. La estructura de cadena principal adecuada incluye enlaces de carbonato (3A, R=O) y carbamato (3A, R=NH<sub>2</sub>) (Mertes y Coats, 1969; Gait, Jones y col., 1974); enlaces de alquil fosfonato y de fosfotriéster (3B, R=alquilo ó -O-alquilo) (Lesnikowski, Jaworska y col., 1990); enlaces de amida (3C) (Blommers, Pieleas y col., 1994); enlaces de sulfona y sulfonamida (3D, R1, R2 = CH<sub>2</sub>); y un enlace de tioformacetilo (3E) (Cross, Rice y col., 1997). Se ha publicado que el último tiene estabilidad dúplex y tríplex potenciada con respecto a los compuestos antisentido de fosforotioato (Cross, Rice y col., 1997). También se han publicado compuestos de 3'-metilen-N-metilhidroxiamino de estructura 3F.

35 Una estructura de oligómero preferida emplea subunidades basadas en morfolino que portan restos de pares base como se ilustra en las Figuras 1A-1D, unidas mediante enlaces no cargados, tal como se ha descrito anteriormente. Especialmente preferido es un oligómero de morfolino ligado mediante fosforodiamidato sustancialmente no cargado, tal como se ilustra en las Figuras 2A-2D. Los oligonucleótidos de morfolino, que incluyen oligómeros antisentido, se detallan por ejemplo en las Patentes de EE.UU. de titularidad compartida 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.185.444, 5.521.063 y 5.506.337, todas las cuales se incorporan expresamente a la presente memoria a modo de referencia.

45 Las propiedades importantes de las subunidades basadas en morfolino incluyen: la capacidad de unirse en una forma oligomérica mediante enlaces de cadena principal estables no cargados; la capacidad de soportar una base de nucleótido (por ejemplo, adenina, citosina, guanina, timidina, uracilo e inosina), de tal modo que el polímero formado pueda hibridarse con un ácido nucleico diana de bases complementarias, que incluye ARN diana, valores de Tm por encima de aproximadamente 50°C en oligómeros relativamente cortos (por ejemplo, de 10-12 bases); la capacidad del oligómero para ser transportado activa o pasivamente al interior de las células bacterianas; y la capacidad del heterodúplex oligómero:ARN para resistir una degradación de ARNasa.

### A. Ejemplos de compuestos oligoméricos

50 Los ejemplos de estructuras de cadena principal para oligonucleótidos antisentido de la invención incluyen los tipos de subunidades de β-morfolino mostrados en las Figuras 2A-2D, todas ligadas mediante un enlace de subunidad que contiene fósforo no cargado. La Figura 2A muestra un enlace que contiene fósforo que forma la cadena principal de unidad que se repite de 5 átomos, en donde los anillos de morfolino están ligados mediante un enlace de fosfamida de 1 átomo. La Figura 2B muestra un enlace que produce una cadena principal de unidad que se repite de 6 átomos. En esta estructura, el átomo Y que une el carbono 5' del morfolino con el grupo fosforoso puede ser azufre, nitrógeno, carbono o, preferiblemente, oxígeno. El resto X que cuelga del fósforo puede ser flúor, un alquilo o

un alquilo sustituido, un alcoxi o un alcoxi sustituido, un tioalcoxi o un tioalcoxi sustituido, o un nitrógeno monosustituido, disustituido o no sustituido, incluyendo estructuras cíclicas, tales como morfolininas o piperidinas. El alquilo, alcoxi y tioalcoxi preferiblemente incluyen 1-6 átomos de carbono. Los restos Z son azufre u oxígeno, y preferiblemente son oxígeno.

- 5 Los enlaces mostrados en las Figuras 2C y 2D están diseñados para cadenas principales de unidades de 7 átomos de longitud. En la Estructura 2C, el resto X es como en la Estructura 2B, y el resto Y puede ser metileno, azufre o, preferiblemente, oxígeno. En la Estructura 2D, los restos X e Y son como en la Estructura 2B. Los oligonucleótidos de morfolino particularmente preferidos incluyen aquellos compuestos por estructuras de subunidades de morfolino de la forma mostrada en la Figura 2B, en donde  $X = NH_2$  o  $N(CH_3)_2$ ,  $Y = O$ , y  $Z = O$ .
- 10 Como se ha indicado anteriormente, el oligómero sustancialmente no cargado puede incluir de forma ventajosa un número limitado de enlaces cargados, por ejemplo hasta aproximadamente 1 por cada 5 enlaces no cargados, más preferiblemente hasta aproximadamente 1 por cada 10 enlaces no cargados. Por lo tanto, también se puede incorporar un número pequeño de enlaces cargados, por ejemplo fosforamidato o fosforotioato cargados, en los oligómeros. Un ejemplo de enlace catiónico se muestra en la Figura 3H.
- 15 Los compuestos antisentido pueden prepararse mediante síntesis en fase sólida por etapas, empleando métodos detallados en las referencias citadas anteriormente. En algunos casos, puede ser deseable añadir restos químicos adicionales al compuesto antisentido, por ejemplo para potenciar la farmacocinética o para facilitar la captura o la eliminación del compuesto. Dicho resto puede ser unido covalentemente, típicamente a un extremo del oligómero, de acuerdo a métodos sintéticos estándares. Por ejemplo, la adición de un resto de polietilenglicol o de otro polímero hidrófilo, por ejemplo uno que tenga de 10 a 100 subunidades monoméricas, puede ser útil para potenciar la solubilidad. Uno o más grupos cargados, por ejemplo grupos cargados catiónicos tales como un ácido orgánico, pueden potenciar la captación celular. Con fines de detección se puede unir un resto indicador, tal como fluoresceína o un grupo radiomarcado. Alternativamente, la marca indicador unida al oligómero puede ser un ligando, tal como un antígeno o biotina, capaz de unirse a anticuerpos marcados o a estreptavidina. Para la selección de un resto para unión o modificación de un oligómero antisentido, generalmente es deseable seleccionar compuestos químicos de grupos que sean biocompatibles y que tengan probabilidad de ser tolerados por un sujeto sin efectos secundarios no deseados.
- 20
- 25

### **B. Oligómeros antisentido antibacterianos**

- 30 Además de las características estructurales descritas anteriormente, el compuesto antisentido de la presente invención no contiene más de 12 bases de nucleótidos, y tiene una secuencia de ácido nucleico dirigida (la secuencia que es complementaria a la secuencia diana) de no menos de 10 bases contiguas. La secuencia dirigida es complementaria a una secuencia diana tal como se ha definido anteriormente. El compuesto tiene una  $T_m$ , cuando está hibridado con la secuencia diana, entre aproximadamente 50°C y 60°C, aunque la  $T_m$  puede ser superior, por ejemplo 65°C. La selección de dianas bacterianas, y de secuencias diana de ARNm bacteriano y de secuencias dirigidas complementarias se considera en las dos secciones siguientes.
- 35

### **III. Dianas bacterianas**

Esta sección considera una serie de dianas bacterianas, que incluyen bacterias patógenas, y dianas proteicas bacterianas específicas contra las que se puede dirigir el compuesto antisentido.

#### **A. Dianas bacterianas**

- 40 *Escherichia coli* (*E. coli*): es una bacteria Gram negativa que es parte de la flora normal del tracto gastrointestinal. Existen cientos de cepas de *E. coli*, la mayoría de las cuales son inofensivas y viven en el tracto gastrointestinal de humanos y animales sanos. Actualmente, existen cuatro clases reconocidas de *E. coli* enterovirulenta (el "grupo EEC") que provocan gastroenteritis en humanos. Entre estas están las cepas enteropatógenas (EPEC) y aquellas cuyo mecanismo de virulencia está relacionado con la excreción de enterotoxinas típicas de *E. coli*. Dichas cepas de
- 45 *E. coli* pueden causar varias enfermedades que incluyen aquellas asociadas a la infección del tracto gastrointestinal y del tracto urinario, septicemia, neumonía y meningitis. Los antibióticos no son efectivos contra algunas cepas y no previenen necesariamente la recurrencia de infección.

- Por ejemplo, se estima que la cepa de *E. coli* 0157:H7 provoca entre 10.000 y 20.000 casos de infección en los Estados Unidos anualmente (Centros Federales para el Control y Prevención de Enfermedades). Colitis hemorrágica es el nombre de la enfermedad aguda causada por la *E. coli* 0157:H7. Los niños de preescolar y los mayores son los presentan los mayores riesgos de complicaciones graves. Recientemente, se ha informado de que la cepa de *E. coli* 0157:H7 ha sido la causa de la muerte de cuatro niños que comieron hamburguesas poco cocinadas en un restaurante de comida rápida en el Noroeste Pacífico. (Véase, por ejemplo, Jackson y col., 1998).
- 50

Los ejemplos de secuencias para las cepas de *E. coli* enterovirulentas incluyen los Números de Acceso del

GenBank AB011549, X97542, AF074613, Y11275 y AJ007716.

Salmonella thyphimurium: son bacterias Gram negativas que provocan varias afecciones que oscilan clínicamente entre infecciones gastrointestinales localizadas, gastroenteritis (diarrea, calambres abdominales y fiebre) hasta fiebres entéricas (que incluyen la fiebre tifoidea), que son enfermedades sistémicas graves. La infección por *Salmonella* también provoca pérdidas sustanciales de ganado.

Típico de los bacilos Gram negativos, la pared celular de la *Salmonella spp.* contiene una estructura de lipopolisacárido (LPS) compleja que es liberada en la lisis de la célula y que puede actuar como una endotoxina, lo que contribuye a la virulencia del organismo.

La comida contaminada es el modo principal de transmisión para la infección de *salmonella* no tifoidea, debido al hecho de que la *Salmonella* sobrevive en la carne y en productos animales que no se han cocinado con intensidad. Las fuentes animales más comunes son pollos, pavos, cerdos y vacas; además de otros muchos animales domésticos y salvajes. La epidemiología de la fiebre tifoidea y de otras fiebres entéricas provocadas por la *Salmonella spp.* está asociada a agua contaminada con heces humanas.

Hay vacunas disponibles para la fiebre tifoidea y son parcialmente efectivas; sin embargo, no hay vacunas disponibles para la infección de *Salmonella* no tifoidea. La salmonelosis no tifoidea se controla con prácticas de matadero higiénicas y con una cocción y refrigeración adecuadas de la comida. Los antibióticos están indicados para la enfermedad sistémica, y se ha usado ampicilina con cierto éxito. Sin embargo, en pacientes en tratamiento con cantidades excesivas de antibióticos; pacientes en tratamiento con fármacos inmunosupresores; después de una cirugía gástrica; y en pacientes con anemia hemolítica, leucemia, linfoma o SIDA, la infección de *Salmonella* sigue siendo un problema médico.

Pseudomonas spp.: son varas móviles, Gram negativas, que son clínicamente importantes debido a que son resistentes a la mayoría de antibióticos, y son una causa principal de infecciones adquiridas en hospitales (nosocomiales). La infección es más común en: individuos inmunocomprometidos, víctimas de quemaduras, individuos con respiración asistida, individuos con catéteres internos, usuarios de narcóticos IV e individuos con enfermedad pulmonar crónica (por ejemplo, fibrosis quística). Aunque la infección es rara en individuos sanos, puede producirse en muchos sitios y conducir a infecciones del tracto urinario, sepsis, neumonía, faringitis y otros muchos problemas, y el tratamiento a menudo falla con una mortalidad significativamente mayor.

Vibrio cholerae: es una vara Gram negativa que infecta humanos y provoca cólera, una enfermedad extendida por malas condiciones de higiene, que da como resultado un suministro de agua contaminado. La *Vibrio cholerae* puede colonizar el intestino delgado humano, donde produce una toxina que afecta al transporte de iones a través de la mucosa, provocando diarrea y pérdida de agua. Los individuos infectados con *Vibrio cholerae* requiere una rehidratación intravenosa u oral con una disolución que contenga electrolitos. La enfermedad generalmente es autolimitante, sin embargo se puede producir la muerte por deshidratación y pérdida de electrolitos esenciales. Se ha demostrado que antibióticos como la tetraciclina acortan el curso de la enfermedad, y actualmente se están desarrollando vacunas orales.

Neisseria gonorrhoea: es un coco Gram negativo, que es el agente causante de la enfermedad común de transmisión sexual llamada gonorrea. La *Neisseria gonorrhoea* puede variar sus antígenos superficiales, previniendo el desarrollo de inmunidad frente a la reinfección. Anualmente se reportan cerca de 750.000 casos de gonorrea en los Estados Unidos, estimándose otros 750.000 casos adicionales no reportados anualmente, la mayoría entre adolescentes y adultos jóvenes. La ampicilina, la amoxicilina o algún tipo de penicilina son recomendados para el tratamiento de la gonorrea. Sin embargo, la incidencia de la gonorrea resistente a penicilina está aumentando, y ahora se usan nuevos antibióticos administrados mediante inyección, por ejemplo ceftriaxona o espectinomina, para tratar la mayoría de infecciones gonococales.

Staphylococcus aureus: es un coco Gram positivo que normalmente coloniza la nariz humana y a veces se encuentra en la nariz. El *Staphylococcus* puede provocar infecciones del torrente sanguíneo, neumonía e infecciones en zonas quirúrgicas en las instalaciones hospitalarias (es decir, infecciones nosocomiales). El *Staph. aureus* puede provocar un envenenamiento alimentario severo, y muchas cepas crecen en la comida y producen exotoxinas. La resistencia del *Staphylococcus* a los antibióticos comunes, por ejemplo vancomicina, ha surgido en los Estados Unidos y en el extranjero como un reto importante para la sanidad pública, tanto en instalaciones comunitarias como hospitalarias. Recientemente también se ha identificado un aislado de *Staph. aureus* resistente a vancomicina en Japón.

Mycobacterium tuberculosis: es una bacteria Gram positiva que es el agente causante de la tuberculosis, una enfermedad a veces paralizante y mortal. La tuberculosis se encuentra en auge y globalmente es la causa principal de muerte a partir de una única enfermedad infecciosa (con una tasa de mortandad actual de tres millones de personas al año). Puede afectar a varios órganos del cuerpo humano, incluyendo el cerebro, los riñones y los huesos, sin embargo, la tuberculosis afecta más comúnmente a los pulmones.

En los Estados Unidos, aproximadamente diez millones de individuos están infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, indicado por ensayos cutáneos positivos, con aproximadamente 26.000 nuevos casos de enfermedad activa cada año. El aumento de los casos de tuberculosis (TB) ha sido asociado a VIH/SIDA, vivir en la calle, abuso de drogas e inmigración de personas con infecciones activas. Los programas actuales de tratamiento para TB susceptible a fármaco implican tomar de dos a cuatro fármacos (por ejemplo, isoniazid, rifampin, pyrazinamide, ethambutol o estreptomycin), durante un periodo de entre seis y nueve meses, debido a que todos los gérmenes de TB no pueden ser destruidos mediante un único fármaco. Adicionalmente, la observación de cepas resistentes a fármacos y cepas resistentes a múltiples fármacos de *Mycobacterium tuberculosis* está en auge.

*Helicobacter pylori* (H. pylori): es un organismo flagelado micro-aerófilo, Gram negativo, de crecimiento lento, con una morfología espiral o en forma de S que infecta el recubrimiento estomacal. El *H. pylori* es un patógeno gástrico humano asociado a gastritis superficial crónica, enfermedad de úlcera péptica y gastritis atrófica crónica que conduce a adenocarcinoma gástrico. El *H. pylori* es una de las infecciones bacterianas crónicas más comunes en humanos y se encuentra en más del 90% de pacientes con gastritis activa. El tratamiento actual incluye una terapia triple con fármacos, bismuto, metronidazol y tetraciclina o amoxicilina, que erradica el *H. pylori* en la mayoría de los casos. Los problemas con la terapia triple incluyen la conformidad del paciente, efectos secundarios y resistencia al metronidazol. Regímenes alternativos de terapia dual que se muestran prometedores son amoxicilina más metronidazol, u omeprazol más amoxicilina.

*Streptococcus pneumoniae*: es un coco Gram positivo y una de las causas más comunes de neumonía bacteriana, así como de infecciones del oído medio (otitis media) y meningitis. Cada año en los Estados Unidos las enfermedades pneumococales contabilizan aproximadamente 50.000 casos de bacteremia; 3.000 casos de meningitis; 100.000-135.000 hospitalizaciones; y 7 millones de casos de otitis media. La infección pneumococal causa una estimación de 40.000 muertes al año en los Estados Unidos. Los niños menores de 2 años de edad, los adultos por encima de 65 años de edad y las personas de cualquier edad con condiciones médicas subyacentes, que incluyen, por ejemplo, enfermedad cardíaca congestiva, diabetes, enfisema, enfermedad hepática, células falciformes, VIH, y aquellas que viven en entornos especiales, por ejemplo, hogares de ancianos e instalaciones de cuidados a largo plazo, son los que tienen mayor riesgo de infección.

Las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a fármaco se han vuelto comunes en los Estados Unidos, con muchos neumococos resistentes a penicilina también resistentes a otros fármacos antimicrobianos, tales como eritromicina o trimetoprim-sulfametoxazol.

*Treponema pallidum*: es un espirochete que provoca sífilis. El *T. pallidum* es exclusivamente un patógeno que provoca sífilis, treponematosi y sífilis endémica no venérea o pinta. El *Treponema pallidum* no puede cultivarse *in vitro* y se replica en ausencia de células de mamífero. La infección inicial provoca una úlcera en la zona de la infección; sin embargo, las bacterias se mueven a través del cuerpo, dañando muchos órganos con el tiempo. En sus últimos estadios, la sífilis no tratada, aunque no es contagiosa, puede provocar graves anomalías cardíacas, trastornos mentales, ceguera, otras problemas neurológicos y muerte.

Normalmente la sífilis se trata con penicilina, administrada mediante inyección. Existen otros antibióticos para pacientes alérgicos a la penicilina, o para quienes no responden a las dosis usuales de penicilina. En todos los estadios de la sífilis un tratamiento apropiado cura la enfermedad, pero en la sífilis tardía no se puede revertir el daño ya hecho a órganos del cuerpo.

*Chlamydia trachomatis*: es la enfermedad de transmisión sexual bacteriana más común en los Estados Unidos y se estima que se producen 4 millones de nuevos casos cada año, las mayores tasas de infección se dan en edades de 15 a 19 años. La *Chlamydia* es una causa principal de uretritis no gonococal (NGU, del inglés “non-gonococcal urethritis”), cervicitis, vaginitis bacteriana y enfermedad inflamatoria pélvica (PID, del inglés “pelvic inflammatory disease”). Las infecciones de *Chlamydia* pueden tener síntomas muy suaves o ningún síntoma, sin embargo, si se dejan sin tratar las infecciones de *Chlamydia* pueden conducir a un daño grave en los órganos reproductores, particularmente en mujeres. Habitualmente se prescriben antibióticos tales como azitromicina, eritromicina, ofloxacina, amoxicilina o doxiciclina para tratar la infección de *Chlamydia*.

*Bartonella henselae*: La fiebre del arañazo de gato (CSF, del inglés “Cat Scratch Fever”) o enfermedad del arañazo de gato (CSD, del inglés “Cat Scratch Disease”) es una enfermedad de humanos adquirida a través de la exposición a gatos, provocada por una vara Gram negativa denominada *Rochalimaea henselae*, y actualmente conocida como *Bartonella henselae*. Los síntomas incluyen fiebre y nodos linfáticos hinchados y la CSF generalmente es una enfermedad relativamente benigna, autolimitante en gente, sin embargo, la infección con *Bartonella henselae* puede producir distintos síntomas clínicos en gente inmunocomprometida, que incluyen enfermedad febril aguda con bacteremia, angiomas bacilar, hepatitis peliosis, esplenitis bacilar, y otras manifestaciones de enfermedad crónica tales como encefalopatía de SIDA.

La enfermedad se trata con antibióticos, tales como doxiciclina, eritromicina, rifampina, penicilina, gentamicina, ceftriaxona, ciprofloxacina y azitromicina.

*Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) es una familia de bacterias Gram negativas; de la cual se conocen seis tipos, siendo la mayoría de las enfermedades relacionadas con *H. influenzae* provocadas por el tipo B, o "HIB". Hasta que se desarrolló una vacuna para la HIB, la HIB era una causa común de otitis media, infecciones sinusales, bronquitis la causa más común de meningitis, y el culpable habitual en casos de neumonía, artritis séptica (infecciones articulares), celulitis (infecciones de tejidos blandos) y pericarditis (infecciones de la membrana que rodea el corazón). La bacteria de *H. influenzae* tipo B está muy extendida en humanos y habitualmente vive en la garganta y la nariz sin provocar enfermedades. Los niños no vacunados por debajo de 5 años presentan riesgo de enfermedad HIB. La meningitis y otras infecciones graves provocadas por la infección de *H. influenzae* pueden conducir a daños cerebrales o a la muerte.

*Shigella dysenteriae* (*Shigella dys.*): es una vara Gram negativa que provoca disentería. En el colon, las bacterias entre las células mucosales y se dividen dentro de las células mucosales, dando como resultado una respuesta inflamatoria extensiva. La infección de *Shigella* puede provocar una diarrea grave que puede conducir a la deshidratación y puede ser peligrosa para los muy jóvenes, los muy viejos o los enfermos crónicos. La *Shigella dys.* forma una potente toxina (toxina shiga), que es citotóxica, enterotóxica, neurotóxica y que actúa como un inhibidor de la síntesis de proteínas. Se ha desarrollado resistencia a antibióticos tales como la ampicilina y TMP-SMX, sin embargo, el tratamiento con antibióticos más nuevos y más caros tales como la ciprofloxacina, norfloxacina y enoxacina, sigue siendo efectiva.

*Listeria*: es un género de bacterias móviles Gram positivas encontradas en heces de humanos y animales. La *Listeria monocytogenes* provoca enfermedades tales como listeriosis, meningoencefalitis y meningitis. Este organismo es uno de las causas principales de muerte por patógenos en alimentos, especialmente en mujeres embarazadas, recién nacidos, mayores e individuos inmunocomprometidos. Se encuentra en entornos tales como materia vegetal en descomposición, alcantarillas, agua y suelos, y puede sobrevivir a extremos tanto de temperatura como de concentración salina, lo que la hace un patógeno de alimentos extremadamente peligroso, especialmente en comida que no es recalentada. La bacteria se puede esparcir desde la zona de infección en los intestinos hasta el sistema nervioso central y la unidad fetal-placentar. Como resultado de su infección se puede producir meningitis, gastroenteritis y septicemia. En ganado y ovejas, la infección de listeria provoca encefalitis y abortos espontáneos.

*Proteus mirabilis*: es una comensal entérica Gram negativa, pariente lejana de la *E. coli*. Normalmente coloniza la uretra humana, pero es un patógeno oportunista que es la causa principal de infecciones del tracto urinario en individuos cateterizados. La *P. mirabilis* tiene dos características excepcionales: 1) tiene una movilidad muy rápida, que se manifiesta como un fenómeno de enjambre en placas de cultivo; y 2) produce ureasa, que le proporciona la capacidad de degradar urea y sobrevivir en el tracto genitourinario.

*Yersinia pestis*: es el agente causante de la peste (bubónica y pulmonar), una enfermedad devastadora que ha matado a millones en todo el mundo. El organismo puede transmitirse desde ratas a humanos a través del mordisco de una pulga infectada o de humano a humano a través del aire durante una infección extendida. La *Yersinia pestis* es un organismo extremadamente patógeno que requiere un número muy pequeño para causar enfermedad, y a menudo es letal si se deja sin tratar. El organismo es enteroinvasivo, y puede sobrevivir y propagarse en macrófagos antes de extenderse sistémicamente por el hospedante.

*Bacillus anthracis*: también conocido como ántrax. Los humanos se infectan cuando entran en contacto con un animal contaminado. El ántrax no se transmite debido a un contacto persona a persona. Las tres formas de la enfermedad reflejan las zonas de infección que incluyen cutánea (piel), pulmonar (pulmón) e intestinal. Las infecciones pulmonares e intestinales a menudo son fatales si no se tratan. Las esporas son absorbidas por los macrófagos y se vuelven internalizadas en fagolisozomas (compartimentos membranosos) en donde se inicia la germinación. Las bacterias son liberadas en el torrente sanguíneo una vez que el macrófago infectado es lisado tras lo que se multiplican rápidamente, extendiéndose a lo largo de los sistemas circulatorio y linfático, un proceso que da como resultado un choque séptico, insuficiencia respiratoria y fallo orgánico. Las esporas de este patógeno se han usado como arma de terrorismo.

*Burkholderia mallei*: raramente se asocia a infección en humanos y más comúnmente se produce en animales domésticos tales como caballos, burros y mulas, en los que provoca glanders, una enfermedad descrita por primera vez por Aristóteles. Este organismo se similar a *B. pseudomallei* y se diferencia por no ser móvil. El patógeno se adapta al hospedante y no se encuentra en el entorno fuera de su hospedante. La glanders a menudo es fatal si no se trata con antibióticos, y la transmisión puede producirse a través del aire, o más comúnmente cuando se está en contacto con animales infectados. Los resultados habituales durante la infección son neumonía de inicio rápido, bacteremia (extendida en el organismo a través de la sangre), pústulas y muerte. Los mecanismos de virulencia no son bien conocidos, aunque es necesario un sistema de secreción de tipo III similar al de *Salmonella typhimurium*. No existe vacuna para este organismo potencialmente peligroso, que se cree tiene potencial como agente terrorista biológico. El genoma de este organismo porta un gran número de secuencias de inserción en comparación con la *Burkholderia pseudomallei* relacionada (ver más adelante), y un gran número de repeticiones de secuencia sencillas que pueden funcionar en variación antigénica de proteínas de la superficie celular.

*Bukholderia pseudomallei*: es el organismo que causa meliodosis, una enfermedad que se da en partes de Asia, Tailandia y Australia. Típicamente es un organismo del suelo y se recuperado en suelos de arrozales y suelo de selva tropical, pero como patógeno oportunista puede provocar enfermedad en individuos susceptibles tales como aquellos que padecen de diabetes mellitus. El organismo puede existir intracelularmente, y causa neumonía y bacteremia (extensión de la bacteria a través del torrente sanguíneo). El periodo de latencia puede ser extremadamente largo, precediendo la infección a la enfermedad en décadas, y el tratamiento puede tomar meses de uso de antibióticos, siendo la recaída un fenómeno observado comúnmente. La extensión intercelular puede producirse vía inducción de polimerización de actina en un polo de la célula, permitiendo el movimiento a través del citoplasma y de célula a célula. Este organismo porta una serie de pequeñas repeticiones de secuencia que pueden promover la variación antigénica, similar a lo que se observa en el genoma de *B. mallei*.

*Francisella tularensis*: se observó por primera vez como agente causante de una enfermedad tipo peste que afectaba a las ardillas en el condado de Tulare en California a principios del siglo 20 por Edward Francis. El organismo lleva su nombre de pila. La enfermedad se denomina tularemia y se ha observado a lo largo de la historia registrada. El organismo puede transmitirse desde garrapatas o moscas de ciervo infectadas a un humano, a través de carne infectada, o a través de un aerosol, y por tanto es un agente bioterrorista potencial. Es un organismo acuático, y puede encontrarse viviendo dentro de protozoos, similar a lo observado con la *Legionella*. Tiene una elevada tasa de infectividad, y puede invadir células fagocíticas y no fagocíticas, multiplicándose rápidamente. Una vez dentro de un macrófago, el organismo puede escapar del fagosoma y vivir en el citosol.

Aplicaciones veterinarias: Una microflora saludable en el tracto gastro-intestinal de ganado es de importancia vital para la salud y la correspondiente producción de productos alimenticios asociados. Como en los humanos, el tracto gastrointestinal de un animal sano contiene numerosos tipos de bacterias (es decir, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella spp.*), que viven en equilibrio biológico unas con otras. Este equilibrio puede verse alterado por un cambio en la dieta, estrés o en respuesta a antibióticos u otros tratamientos terapéuticos, dando como resultado enfermedades bacterianas en los animales provocadas generalmente por bacterias tales como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Enterococci*, *Tularemia* y *E. coli*. La infección bacteriana en estos animales a menudo necesita de intervención terapéutica, que tiene costes de tratamiento y está asociada frecuentemente a un descenso de la productividad.

Como resultado, el ganado se trata de forma rutinaria con antibióticos para mantener el equilibrio de la flora en el tracto gastrointestinal. Las desventajas de esta estrategia son el desarrollo de bacterias resistentes a antibióticos y la transmisión de dichos antibióticos y las bacterias resistentes a los productos alimenticios resultantes para el consumo humano.

## **B. División celular y proteínas diana del ciclo celular**

Los oligómeros antisentido de la invención se diseñan para hibridarse con una región de un ARNm bacteriano que codifica un gen bacteriano esencial. Los ejemplos de genes son aquellos que se requieren para la división celular, las proteínas del ciclo celular, o los genes requeridos para la biosíntesis de lípidos o la replicación de ácido nucleico. Cualquier gen bacteriano esencial puede ser diana una vez que se ha determinado la esencialidad del gen. Una estrategia para determinar qué genes de un organismo son esenciales es el uso de técnicas de huella genética como se ha descrito (Gerdes, Scholle y col., 2003). En esta publicación, se identificaron 620 genes de *E. coli* como esenciales y 3.126 genes como dispensables para el crecimiento en condiciones de cultivo para un crecimiento aeróbico robusto. El análisis del contexto evolucionario demostró que un número significativo de genes esenciales de *E. coli* son preservados a lo largo del reino bacteriano, especialmente el subconjunto de genes para procesos celulares clave tales como la replicación de ADN y la síntesis de proteínas.

En varios aspectos, la invención proporciona un oligómero antisentido que es una secuencia de ácido nucleico que es efectiva para unirse de forma estable y específica a una secuencia diana de ácido nucleico que codifica una proteína bacteriana esencial, que incluye lo siguiente: (1) una secuencia específica de una cepa particular de una especie dada de bacterias, tal como una cepa de *E. coli* asociada a envenenamiento alimentario, por ejemplo 0157:H7 (véase la Tabla 1 más adelante); (2) una secuencia común a dos o más especies de bacterias; (3) una secuencia común a dos géneros relacionados de bacterias (es decir, géneros de bacterias de origen filogenético similar); (4) una secuencia conservada generalmente entre bacterias Gram negativas; (5) conservada generalmente entre bacterias Gram positivas; o (6) una secuencia de consenso para secuencias bacterianas esenciales de ácido nucleico que codifican proteínas en general.

En general, la diana para la modulación de expresión génica usando los métodos antisentido de la presente invención comprenden un ARNm expresado durante el crecimiento o replicación bacteriano activo, tal como una secuencia de ARNm transcrita a partir de un gen implicado en la biosíntesis de lípidos (por ejemplo, *acpP*).

La división celular en *E. coli* implica la invaginación coordinada de las 3 capas de la cubierta celular (membrana citoplásmica, capa de péptidoglicano rígido y membrana exterior). La constricción del septum divide la célula en 2 compartimentos y segrega el ADN replicado. En este proceso participan al menos 9 productos génicos esenciales:

*ftsZ*, *ftsA*, *ftsQ*, *ftsL*, *ftsI*, *ftsN*, *ftsK*, *ftsW* y *zipA* (Hale y de Boer, 1999). La diana proteica se discute más adelante.

*AcpP* codifica proteína portadora de acilo, un cofactor esencial en la biosíntesis de lípidos. El mecanismo biosintético de ácidos grasos requiere que la proteína portadora de acilo cofactor térmicamente estable se una a intermedios en el mecanismo.

- 5 Para esta proteína y una serie de otras la Tabla 1 proporciona ejemplos de secuencias bacterianas que contienen una secuencia diana para una serie de bacterias patógenas importantes. Las secuencias génicas derivan de la secuencia del genoma completo de la Referencia del GenBank para cada cepa bacteriana (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>). La localización del gen en la cepa positiva (+) o en la negativa (-) del genoma se incluye bajo el epígrafe "Cadena", reconociéndose que la cadena indicada es la secuencia que codifica para la proteína, es decir, la secuencia correspondiente a la secuencia diana de ARNm para dicho gen. Por ejemplo, los dos genes de *E. coli* (*ftsZ* y *acpP*) en los que la secuencia codificadora está en la cadena positiva, la secuencia se lee de 5' a 3' en la dirección izquierda a derecha. De forma similar para el gen *gyrA* de *E. coli* que tiene la región codificadora en la cadena genómica menos, la secuencia codificadora se lee como el complemento inverso en la dirección derecha a izquierda (5' a 3').

15 **Tabla 1. Ejemplos de secuencias génicas bacterianas diana**

Organismo	Referencia del GenBank	Gen Diana	Cadena	Región de nucleótido
<i>Escherichia coli</i>	NC	<i>ftsZ</i>	+	105305-106456
	000913	<i>acpP</i>	+	1150838-1151074
		<i>gyrA</i>	-	2334813-2337440
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	NC	<i>ftsZ</i>	+	109911-111062
	002655	<i>acpP</i>	+	1595796-1596032
		<i>gyrA</i>	-	3133832-3136459
<i>Salmonella thyphimurium</i>	NC	<i>ftsZ</i>	+	155683-156834
	003197	<i>acpP</i>	+	1280113-1280349
		<i>gyrA</i>	-	2373711-2376347
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NC	<i>ftsZ</i>	-	4939299-4940483
	002516	<i>acpP</i>	-	3324946-3325182
		<i>gyrA</i>	-	3556426-3559197
<i>Vibrio cholera</i>	NC	<i>ftsZ</i>	-	2565047-2566243
	002505	<i>acpP</i>	+	254505-254747
		<i>gyrA</i>	+	1330207-1332891
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	NC	<i>ftsZ</i>	-	1498872-1500050
	002946	<i>acpP</i>	+	1724401-1724637

Organismo	Referencia del GenBank	Gen Diana	Cadena	Región de nucleótido
		<i>gyrA</i>	-	618439-621189
<i>Staphylococcus aureus</i>	NC	<i>ftsZ</i>	+	1165782-1166954
	002745	<i>gyrA</i>	+	7005-9674
		<i>fmhB</i>	-	2321156-2322421
<i>Mycobacterium</i>	NC	<i>ftsZ</i>	-	2407076-2408281
<i>tuberculosis</i>	002755	<i>acpP</i>	+	1510182-1510502
		<i>gyrA</i>	+	7302-9818
		<i>pimA</i>	-	2934009-2935145
		<i>cysS2</i>	-	4014534-4015943
<i>Helicobacter pylori</i>	NC	<i>ftsZ</i>	+	1042237-1043394
	000915	<i>acpP</i>	-	594037-594273
		<i>gyrA</i>	+	752512-754995
<i>Streptococcus</i>	NC	<i>ftsZ</i>	-	1565447-1566706
<i>pneumoniae</i>	003028	<i>acp</i>	+	396691-396915
		<i>gyrA</i>	-	1147387-1149855
<i>Treponema palladium</i>	NC	<i>ftsZ</i>	+	414751-416007
	000919	<i>acp</i>	+	877632-877868
		<i>gyrA</i>	+	4391-6832
<i>Chlamydia trachomatis</i>	NC	<i>acpP</i>	-	263702-263935
	000117	<i>gyrA</i>	-	755022-756494
<i>Bartonella henselae</i>	NC	<i>ftsZ</i>		1232094-1233839
	005956	<i>acpP</i>	+	623143-623379
		<i>gyrA</i>	-	1120562-1123357
<i>Hemophilis influenza</i>	NC	<i>ftsZ</i>	+	1212021-1213286

Organismo	Referencia del GenBank	Gen Diana	Cadena	Región de nucleótido
	000907	<i>acpP</i>	-	170930-171160
		<i>gyrA</i>	-	1341719-1344361
<i>Listeria monocytogenes</i>	NC	<i>ftsZ</i>	-	2102307-2101132
	002973	<i>acpP</i>	-	1860771-1860538
		<i>gyrA</i>	+	8065-10593
<i>Yersinia pestis</i>	NC	<i>ftsZ</i>	+	605874-607025
	003143	<i>acpP</i>	+	1824120-1824356
		<i>gyrA</i>	+	1370729-1373404
<i>Bacillus anthracis</i>	NC	<i>ftsZ</i>	-	3724197-3725357
	005945	<i>acpP</i>	-	3666663-3666898
		<i>gyrA</i>	+	6596-9067
<i>Burkholderia mallei</i>	NC	<i>ftsZ</i>	-	2649616..2650812
	006348	<i>acpP</i>	+	559430..559669
		<i>gyrA</i>	-	459302..461902
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	NC	<i>ftsZ</i>	-	3599162-3600358
	006350	<i>acpP</i>	-	2944967-2945206
		<i>gyrA</i>	-	3036533-3039133
<i>Francisella tularensis</i>	NC	<i>ftsZ</i>	+	203748-204893
	006570	<i>acpP</i>	+	1421900-1422184
		<i>gyrA</i>	-	1637300-1639906

### C. Selección de secuencias diana y longitudes del oligómero

5

Tal como se ha indicado anteriormente, la presente invención deriva del descubrimiento aquí de que compuestos oligoméricos antisentido que tienen una cadena principal de subunidad de ribosa o morfolino son más efectivos para la inhibición del crecimiento bacteriano cuando la longitud de subunidad está entre 10 y 12 bases, preferiblemente 11-12 bases, que son complementarias a la secuencia de ARNm diana. Estos estudios fueron llevados a cabo sobre la expresión de genes bacterianos en cultivos puros, un sistema de expresión de proteínas libre de células y en un modelo murino *in vivo* de peritonitis, tal como se discute con detalle en los ejemplos mostrados a continuación.

El Ejemplo 1 describe el estudio sobre el efecto de la longitud antisentido y la posición sobre la inhibición de un gen

5 indicador (*myc-luc*) en *E. coli*, mostrándose los resultados en la Figura 4. En los datos mostrados en la Figura 4, la barra a rayas indica el truncado desde el extremo 3' de una secuencia antisentido anti-*myc-luc* de 20 monómeros definida por la SEC ID N°: 71 (véase la Tabla 3 más adelante), y la barra rellena representa el truncado de la misma secuencia desde su extremo 5'. De este modo, por ejemplo, la barra a rayas de secuencia de 7 monómeros corresponde a la SEC ID N°: 59, y la barra rellena de 7 monómeros a la SEC ID N°: 83. A la temperatura reducida de 30°C, un PMO de tan solo 7 bases también causó una inhibición significativa (por ejemplo, véase la Figura 4 y el Ejemplo 1), probablemente debido a que la temperatura de fusión ( $T_m$ ) se encuentra entre 30 y 37°C para un PMO de 7 bases. Sin embargo, por encima de 12-13 bases, se produce una caída significativa de la inhibición de traducción de proteína observada. Este comportamiento es contrario al comportamiento predicho para compuestos antisentido de oligonucleótidos en base a su capacidad para inhibir la traducción de proteínas en un sistema bacteriano o en un sistema eucariótico libre de células, o en un sistema de expresión de célula de mamífero, como se verá más adelante.

15 El efecto de la longitud del compuesto antisentido en un sistema de expresión libre de células bacterianas se muestra en la Figura 5. Los datos muestran el grado de inhibición del gen indicador mediante secuencias antisentido que tienen el número indicado de bases y que han sido truncadas en el extremo 5' (barras sombreadas) o en el extremo 3' (barras a rayas) de la secuencia de 20 monómeros definida más adelante como ID N°: 71. Para las secuencias truncadas en el extremo 3', se observó una fuerte inhibición para compuestos antisentido de longitudes entre 9 y 20, correspondientes a las secuencias identificadas como SEC ID N°: 61 a 71. Para las secuencias truncadas en el extremo 5', se observó una fuerte inhibición para compuestos antisentido de longitudes entre 12 y 20, correspondientes a las secuencias identificadas como SEC ID N°: 71 a 78. Al contrario que los estudios de inhibición presentados en la Figura 4 para células bacterianas intactas, los datos del sistema libre de células de la Figura 5 muestran una fuerte inhibición para longitudes antisentido de hasta 20 bases.

25 Los datos de la Figura 5 indican un efecto posicional de la secuencia, así como un efecto de la longitud de la secuencia, para la inhibición antisentido en un sistema libre de células. Para examinar mejor este efecto, se examinaron en el mismo sistema libre de células compuestos antisentido PMO de longitud 10 y que presentan las posiciones relativas, respecto al sitio de inicio AUG del ARNm, mostradas para los números de PMO indicados en la Tabla 3 más adelante. Los datos muestran que la mayor inhibición se alcanza cuando la secuencia antisentido solapa con el sitio de inicio AUG (PMOs 358, 359, 360, 361, 362 y 363; SEC ID N°: 93 a 98) o cuando está por debajo del sitio de inicio (PMOs 357, 356 y 208; SEC ID N°: 92, 91 y 62, respectivamente). Sin embargo, se observa un descenso de la inhibición cuando la mayoría de las bases está por encima del sitio de inicio (PMOs 331 y 364; SEC ID N°: 80 y 99). Más generalmente, la secuencia antisentido debería solapar con el sitio de inicio AUG del ARNm diana o estar posicionado a al menos 10 bases del sitio de inicio.

35 Evidencias recientes sugieren que el péptido-PNA inhibió la expresión de  $\beta$ -lactamasa solo cuando se dirige contra la secuencia de unión de ribosoma Shine-Dalgarno (RBS, del inglés "ribosome binding sequence") o a la región en torno al codón de inicio, pero no a ningún otro sitio de la longitud completa del ARNm (Drysellus, Aswasti y col., 2003). Los resultados obtenidos como apoyo para la presente invención indican que el RBS no es una diana efectiva para la inhibición de PMO, al menos para el gen indicador quimérico *myc-luc*, al contrario que los resultados observados para un compuesto PNA antisentido-

40 Los resultados de la Figura 4 también son impredecibles a partir de los efectos de inhibición antisentido observados en células de mamífero. Los estudios dirigidos a examinar el efecto de compuestos antisentido de diferente longitud sobre la inhibición del gen *myc-luc* en células HeLa se describen en el Ejemplo 1 y se muestran en la Figura 11, en la que las barras huecas representan un compuesto de 11 monómeros, las barras con trama cruzada, uno de 20 monómeros, y las barras rellenas, una secuencia de no sentido. La expresión de luciferasa a las 7 y 24 horas de la exposición al compuesto muestra una inhibición significativamente mayor para el compuesto antisentido de mayor tamaño. De forma similar, cuando el efecto de la longitud del compuesto antisentido se evaluó en un sistema de síntesis libre de células de mamífero (reticulocitos de conejo), la inhibición aumentó sucesivamente entre aproximadamente 10 y 17 bases, observándose una inhibición muy fuerte para un compuesto de 20 monómeros, como se observa en la Figura 12.

50 Para confirmar que un compuesto antisentido de oligómero que tiene longitudes relativamente cortas, por ejemplo de 10-12 bases, proporciona una inhibición óptima de una proteína de bacteria, se evaluaron compuestos antisentido dirigidos contra la región del sitio de inicio AUG del gen bacteriano *AcpP* para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano en cultivo. Estos estudios se muestran en el Ejemplo 2, con referencia a las Figuras 9A y 9B. Como se observa en la última figura, se observó una sorprendente inhibición para compuestos antisentido que tienen entre 10 y 14 bases, observándose una casi completa inhibición para el compuesto con una longitud de 11 bases. Como con los estudios de expresión que implican genes indicadores descritos anteriormente, los resultados para la inhibición de un gen bacteriano en bacterias son impredecibles a partir del comportamiento de los mismos compuestos antisentido en un sistema bacteriano libre de células. Como se observa en la Figura 10, la mayor inhibición se observó para los compuestos antisentido entre 11 y 20 bases.

Se analizaron otras características del PMO para detectar una correlación con la inhibición de *myc-luc*. El contenido de G más C del PMO no se correlacionó con la inhibición. Sin embargo, una correlación significativa entre la inhibición y la estructura secundaria teórica de la región diana sugiere que el emparejamiento de bases dentro de la región diana puede reducir la eficacia del PMO (Figuras 8A y 8B y Ejemplo 1). El PMO dirigido a secuencias muy por debajo (en dirección 3') del codón de inicio AUG, significativamente más allá de 10 bases desde la primera base del codón de inicio, no inhibió la expresión. Cada uno de los PMO por debajo se dirigió a una estructura secundaria predicha diferente. Un PMO (215, SEC ID N°: 101) se dirigió a una región predicha para formar una estructura tipo tallo con 10 de sus 11 bases emparejadas con una tira contigua de bases complementarias más abajo. El otro PMO por debajo (214, SEC ID N°: 100) se dirigió a una región predicha para formar una región de cadena sencilla con todas sus 11 bases no emparejadas. La estructura secundaria diana no parece ser un factor para la falta de eficacia del PMO dirigido a secuencias muy por debajo del codón de inicio.

Estudios llevados a cabo como apoyo de la presente invención, y descritos más adelante con respecto a las Figuras 11 y 12, indican que la actividad antisentido de compuestos antisentido oligoméricos cortos, respecto a compuestos más largos, también es impredecible a partir de la actividad antisentido observada en sistemas eucarióticos. La Figura 11 muestra la inhibición de expresión de luciferasa (ligada al gen *acpP*) producida por un PMO que tiene 11 bases (barras huecas) o 20 bases (barras con entramado) a 7 y 24 horas tras la exposición de células al compuesto antisentido. Como se observa, se obtuvo una inhibición sustancialmente mayor con el compuesto antisentido de 20 monómeros a ambos tiempos. La mayor capacidad de los compuestos antisentido oligoméricos de mayor longitud para inhibir la traducción eucariótica también se demuestra mediante el estudio mostrado en la Figura 12. Es evidente a partir de este estudio que los compuestos oligoméricos de más de 12 bases de longitud son más efectivos para inhibir la traducción de ARNm que los que tienen una longitud de entre 10 y 12 bases.

En base a estas consideraciones, las secuencias dirigidas para su uso en la práctica de la invención son aquellas que tienen entre 10 y 12 bases, preferiblemente con una complementariedad completa, y si no con una complementariedad de al menos 10 bases, con la secuencia de ARNm diana, y complementarias a una región del ARNm que incluye el sitio de inicio AUG o una región de hasta 20 bases por debajo del sitio de inicio. Cuando se usa el compuesto de la invención para inhibir una infección de una de las bacterias identificadas en la tabla mostrada más adelante, inhibiendo la proteína *acpP* bacteriana, el compuesto antisentido oligomérico tiene una secuencia que es complementaria a al menos 10 bases contiguas de la secuencia diana correspondiente indicada en la tabla, en donde dichas secuencias diana y otras secuencias son identificadas en el listado de secuencias incluido más adelante como SEC ID N°: 1 - 58.

Tabla 2. Ejemplos de regiones diana bacterianas

Organismo (Ref. GenBank)	Gen diana	Región de nucleótido	SEC ID N°:
<i>Escherichia coli</i>	<i>ftsZ</i>	105295-105325	1
(NC 000913)	<i>acpP</i>	1150828-1150858	2
	<i>gyrA</i>	2337422-2337452	3
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	<i>ftsZ</i>	109901-109931	4
(NC 002655)	<i>acpP</i>	1595786-1595816	5
	<i>gyrA</i>	3136439-3136469	6
<i>Salmonella thyphimurium</i>	<i>ftsZ</i>	155673-155703	7
(NC 003197)	<i>acpP</i>	1280103-1280133	8
	<i>gyrA</i>	2376327-2376357	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>ftsZ</i>	4940463-4940493	10
(NC 002516)	<i>acpP</i>	3325162-3325192	11

Organismo (Ref. GenBank)	Gen diana	Región de nucleótido	SEC ID N°:
	<i>gyrA</i>	3559177-3559207	12
<i>Vibrio cholera</i>	<i>ftsZ</i>	2566223-2566253	13
(NC 002505)	<i>acpP</i>	254495-254525	14
	<i>gyrA</i>	1330197-1330227	15
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	<i>ftsZ</i>	1500031-1500060	16
(NC 002946)	<i>acpP</i>	1724391-1724420	17
	<i>gyrA</i>	621170-621199	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>ftsZ</i>	1165772-1165802	19
(NC 002745)	<i>gyrA</i>	6995-7025	20
	<i>fmhB</i>	2322402-2322431	21
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>ftsZ</i>	2408265-2408295	22
(NC 002755)	<i>acp</i>	1510172-1510202	23
	<i>gyrA</i>	7292-7322	24
	<i>pimA</i>	2935126-2935126	25
	<i>cysS2</i>	4015924-4015953	26
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>ftsZ</i>	1042227-1042257	27
(NC 000915)	<i>acp</i>	594253-594283	28
	<i>gyrA</i>	752502-752532	29
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>ftsZ</i>	1566686-1566716	30
(NC 003028)	<i>acp</i>	396681-396711	31
	<i>gyrA</i>	1149835-1149865	32
<i>Treponema palladium</i>	<i>ftsZ</i>	414741-414771	33
(NC 000919)	<i>acp</i>	877626-877656	34
	<i>gyrA</i>	4381-4411	35
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>acpP</i>	263915-263945	36

Organismo (Ref. GenBank)	Gen diana	Región de nucleótido	SEC ID N°:
(NC 000117)	<i>gyrA</i>	756474-756504	37
<i>Bartonella henselae</i>	<i>ftsZ</i>	1232075-1232104	38
(NC 005956)	<i>acp</i>	623133-623162	39
	<i>gyrA</i>	1123338-1123367	40
<i>Hemophilis influenza</i>	<i>ftsZ</i>	1212011-1212041	41
(NC 000907)	<i>acp</i>	171140-171170	42
	<i>gyrA</i>	1344341-1344371	43
<i>Yersinia pestis</i>	<i>ftsZ</i>	605864-605893	44
(NC 003143)	<i>acp</i>	1824110-1824139	45
	<i>gyrA</i>	1370719-1370748	46
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>ftsZ</i>	3725338-3725367	47
(NC 005945)	<i>acp</i>	3666877-3666906	48
	<i>gyrA</i>	6586-6615	49
<i>Burkholderia mallei</i>	<i>ftsZ</i>	2650793-2650822	50
(NC 006348)	<i>acp</i>	559420-559449	51
	<i>gyrA</i>	461883-461912	52
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>ftsZ</i>	3600339-3600368	53
(NC 006350)	<i>acp</i>	2945187-2945216	54
	<i>gyrA</i>	3039114-3039143	55
<i>Francisella tularensis</i>	<i>ftsZ</i>	203738-203767	56
(NC 006570)	<i>acp</i>	1421890-1421919	57
	<i>gyrA</i>	1639887-1639916	58

5

Tal como se ha descrito anteriormente, se puede determinar un gen bacteriano esencial para cualquier especie bacteriana usando una serie de métodos que incluyen los descritos por Gerdes para la *E. coli* (Gerdes, Scholle y col., 2003). Muchos genes esenciales del reino bacteriano son conservados, lo que proporciona una guía adicional para la selección de dianas. Las regiones diana pueden obtenerse usando recursos bioinformáticos fácilmente disponibles tales como los mantenidos por el National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se pueden obtener las secuencias genómicas de referencia completas para un gran número de especies microbianas (por

ejemplo, véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/proks.cgi>) y se pueden identificar las secuencias correspondientes a genes bacterianos. Se pueden obtener las cepas bacterianas a partir del American Type Culture Collection (ATCC). Los métodos de cultivo de células sencillas, tales como los descritos en los Ejemplos, usando el medio de cultivo apropiado y las condiciones para cualquier especie dada, pueden establecerse para determinar la actividad antibacteriana de compuestos antisentido.

La primera etapa en la selección de un compuesto antisentido adecuado es identificar, empleando los métodos anteriores, una secuencia dirigida que incluya el sitio de inicio AUG y/o que contenga al menos aproximadamente 10-20 bases por debajo del sitio de inicio. La Tabla 2 anterior proporciona las localizaciones base-número de secuencias dirigidas de 30 a 31 bases que se extienden desde el sitio de inicio AUG unas 10 bases en la región codificadora por encima (lado 5') y unas 20 bases en la región codificadora por debajo (incluyendo el sitio de inicio). Las secuencias diana reales correspondientes a estas localizaciones diana-sitio se proporcionan en el listado de secuencias presentado más adelante, identificadas como SEC ID N°: 1-58.

Con fines ilustrativos, se asume que el compuesto antisentido que se va a preparar para su uso en la inhibición de una infección bacteriana de *E. coli* en un individuo infectado con la cepa 0157:H7 de *E. coli*, y que el gen esencial considerado como diana es el gen *acpP* de *E. coli*. Una secuencia diana adecuada para este gen identificada mediante los métodos anteriores es la SEC ID N°: 2, que tiene la secuencia 5'-ATTTAAGAGTATGAGCACTATCGAAGAACGC-3' en donde la secuencia proporciona las bases de timina (T) de ADN en lugar de las bases de uracilo (U) de ARN, y en donde el sitio de inicio AUG (ATG) se muestra en negrita.

Nuevamente, con fines ilustrativos, se seleccionan cuatro secuencias dirigidas antisentido modelo, cada una de ellas con 11 bases de longitud: (i) una secuencia antisentido que se extiende desde el sitio de inicio AUG con cuatro bases de cada lado y que tiene la secuencia identificada como SEC ID N°: 126; (ii) una secuencia antisentido que solapa con el inicio de AUG en su extremo 5' y que se extiende en la dirección 3' otras 8 bases en la región codificadora del gen, identificada como SEC ID N°: 127; (iii) una secuencia antisentido complementaria a las bases 5-15 de la región codificadora del gen, identificada como SEC ID N°: 109, y (iv) una secuencia antisentido complementaria a las bases 11-21 de la región codificadora del gen, identificada como SEC ID N°: 128. Estas secuencias se enumeran en la Tabla 3 presentada a continuación.

Una vez que se han seleccionado las secuencias antisentido y que se ha sintetizado el compuesto antisentido, los compuestos pueden evaluarse para determinar su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano, en este caso el crecimiento de la cepa de *E. coli* en cultivo. Siguiendo el protocolo del Ejemplo 2, por ejemplo, se evalúan individualmente las cuatro secuencias de 11 monómeros descritas anteriormente para determinar la actividad óptima, por ejemplo, la máxima caída en CFU/mL para una dosis dada, por ejemplo 5-20  $\mu$ M, frente a un cultivo de *E. coli*. El(los) compuesto(s) que muestra(n) una actividad óptima se evalúa(n) a continuación en modelos animales, tal como se describe en el Ejemplo 3, o en animales veterinarios, antes de su uso para tratar una infección humana.

Tabla 3. Secuencias de PMO para la proteína *acpP* de *E. coli*

Secuencia (de 5' a 3')	Diana	SEC ID N°:
TGC TCA TAC TC	<i>acpP</i> de <i>E. coli</i>	126
ATA GTG CTC AT	<i>acpP</i> de <i>E. coli</i>	127
CTT CGA TAG TG	<i>acpP</i> de <i>E. coli</i>	109
CG TTC TTC CG	<i>acpP</i> de <i>E. coli</i>	128

#### **IV. Método para inhibir bacterias**

En un aspecto, la invención incluye el compuesto antisentido oligomérico de 10-12 bases del tipo caracterizado anteriormente para uso en la inhibición de infección bacteriana. Este método general se demuestra con el estudio presentado en el Ejemplo 2 y descrito anteriormente con respecto a la Figura 9.

En un aspecto, el compuesto se aplica para inhibir una infección bacteriana en un sujeto mamífero, que incluye un sujeto humano. El compuesto antisentido se va a administrar al sujeto en una cantidad terapéutica. Para demostrar el método, se inyectó IP a grupos de 4 ratones con *E. coli* AS19, que tiene un defecto genético que le hace anormalmente permeable a solutos de alto PM. Inmediatamente después de la infección, todos los ratones fueron inyectados IP con 300  $\mu$ g de un PMO de 11 bases complementario a *acpP*, un PMO de secuencia de no sentido de

11 bases, o PBS, tal como se detalla en el Ejemplo 3. Como se observa en la Figura 13, los ratones tratados con el antisentido dirigido mostraron una reducción de las CFUs bacterianas de aproximadamente 600 a las 23 h, en comparación con el tratamiento de control.

5 Se volvió a evaluar los mismos PMOs, excepto que con *E. coli* SM105, que tiene una membrana exterior normal. En este método, el PMO anti-*acpP* redujo la CFU en un 84% en comparación con el PMO de no sentido a las 12 h de la infección. No se produjo reducción de CFU a las 2, 6 ó 24 h (Figura 14). Los ratones fueron inyectados con una segunda dosis a las 24 h de la infección. Tras 48 h desde la infección las CFU de los ratones tratados con PMO de *acpP* eran un 70% inferiores a las CFU de ratones tratados con PMO de no sentido (Figura 14).

10 Para demostrar que el efecto sobre la infección bacteriana fue específico de secuencia, se usó un gen indicador de luciferasa cuya expresión no afectaría al crecimiento, y se midió la expresión de luciferasa directamente empleando dos criterios independientes, la actividad de luciferasa y la abundancia de proteína de luciferasa. Como se detalla en el Ejemplo 3, el estudio demostró que un compuesto antisentido complementario al ARNm de luciferasa inhibió la expresión de luciferasa a dos tiempos diferentes tras la administración del PMO. Además, la inhibición fue cuantitativamente similar con ambos métodos de medida. Estos resultados demuestran directamente que el PMO  
15 inhibió la expresión de gen diana bacteriano *in vivo* de un modo específico de secuencia.

Cabe destacar que la eficacia *in vivo* de dichos oligómeros antisentido en un sujeto usando los métodos de la invención depende de numerosos factores que incluyen, aunque sin limitación, (1) la secuencia diana; (2) la duración, dosis y frecuencia de la administración antisentido; y (3) de la condición general del sujeto.

20 En otra realización de la invención, los oligonucleótidos antisentido de la invención encuentran utilidad en la preparación de vacunas antibacterianas. En este aspecto de la invención, se incubaba un cultivo de un tipo particular de bacteria en presencia de un oligómero antisentido basado en morfolino del tipo descrito anteriormente, en una cantidad efectiva para producir células bacterianas con dificultades de replicación y/o morfológicamente anormales. Dichas células bacterianas con dificultades de replicación y/o morfológicamente anormales se administran a un sujeto y actúan como vacuna.

25 La eficacia de un oligómero antisentido administrado *in vivo* de la invención para inhibir o eliminar el crecimiento de uno o más tipos de bacterias puede determinarse mediante cultivo *in vitro* o examen microscópico de una muestra biológica (tejido, sangre, etc.) tomada de un sujeto antes, durante o después de la administración del oligómero antisentido. (Véase, por ejemplo, Pari, G.S. y col., *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* 39(5): 1157-1161, 1995; Anderson, KP. y col., *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* 40(9): 2004-2011, 1996). La eficacia de una vacuna  
30 administrada *in vivo* de bacterias tratadas con oligómero antisentido puede determinarse empleando técnicas inmunológicas estándares para la detección de una respuesta inmune, por ejemplo, ELISA, análisis de transferencia Western, radioinmunoensayo (RIA), reacción de linfocito mixta (MLR), ensayo de linfocitos T citotóxicos específicos de bacterias (CTL), etc.

### 35 **A. Métodos de administración**

La administración efectiva de oligómero antisentido al ácido nucleico diana es un aspecto importante del tratamiento. De acuerdo con la invención, las rutas de administración de oligómero antisentido incluyen, aunque sin limitación, diversas rutas sistémicas, que incluyen las rutas oral y parenteral, por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal e intramuscular, así como inhalación, administración transdermal o tópica. La ruta apropiada puede ser determinada por el especialista en la técnica, según sea apropiada para la condición del sujeto en tratamiento. Por ejemplo, una ruta apropiada para la administración de un oligómero antisentido en el tratamiento de una infección bacteriana de la piel es la administración tópica, mientras que la administración de un oligómero antisentido para el tratamiento de una infección respiratoria bacteriana es por inhalación. También se contemplan los métodos efectivos para administrar el oligómero a la zona de infección bacteriana o para introducir el oligonucleótido en el torrente sanguíneo.  
45

La administración transdermal de oligómeros antisentido puede llevarse a cabo mediante el uso de un vehículo farmacéuticamente aceptable adaptado para, por ejemplo, administración tópica. Un ejemplo de administración de oligómero de morfolino se describe en la solicitud de patente PCT WO 97/40854, incorporada a la presente memoria a modo de referencia.

50 En una realización preferida el oligómero es un oligómero de morfolino, contenido en un vehículo farmacéuticamente aceptable, y se administra oralmente.

El oligonucleótido antisentido puede administrarse en cualquier vehículo conveniente que sea fisiológicamente aceptable. Dicha composición de oligonucleótido puede incluir cualquiera de una serie de vehículos estándares aceptados farmacéuticamente empleados por los especialistas en la técnica. Los ejemplos de dichos vehículos

farmacéuticos incluyen, aunque sin limitación, disolución salina, disolución salina de fosfato tamponada (PBS), agua, etanol acuoso, emulsiones tales como emulsiones aceite/agua, emulsiones de triglicéridos, agentes humectantes, comprimidos y cápsulas. Debe entenderse que la elección del vehículo fisiológicamente aceptable adecuado variará en función del modo de administración elegido.

- 5 En algunos casos se pueden emplear liposomas para facilitar la captación del oligonucleótido antisentido en las células. (Véase, por ejemplo, Williams, S.A., *Leukemia* 10(12): 1980-1989, 1996; Lappalainen y col., *Antiviral Res.* 23: 119, 1994; Uhlmann y col., *ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: A NEW THERAPEUTIC PRINCIPLES*, Chemical Reviews, Volume 90, N° 4, páginas 544-584, 1990; Gregoriadis, G., Capítulo 14, *Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine*, páginas 287-341, Academic Press, 1979). También se pueden usar hidrogeles como
- 10 vehículos para la administración de oligómero antisentido, por ejemplo, como se describe en el documento WO 93/01286. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden administrarse en microesferas o micropartículas. (Véase, por ejemplo, Wu, G.Y. y Wu, C.H., *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432, 1987).

- 15 Las composiciones de liberación sostenida también se contemplan dentro del alcance de esta solicitud. Éstas pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, tales como películas o microcápsulas.

- Típicamente, se deben administrar una o más dosis de oligómero antisentido, generalmente a intervalos regulares durante un periodo de aproximadamente una a dos semanas. Las dosis preferidas para la administración oral se encuentran entre aproximadamente 10 mg de oligómero/paciente y aproximadamente 250 mg de oligómero/paciente
- 20 (en base a un peso de 70 kg). En algunos casos pueden necesitarse dosis superiores a 250 mg de oligómero/paciente. Para la administración IV, las dosis preferidas oscilan entre aproximadamente 1,0 mg de oligómero paciente y aproximadamente 100 mg de oligómero/paciente (en base a un peso adulto de 70 kg). El compuesto antisentido generalmente se debe administrar en una cantidad y un modo eficaces para generar una concentración en sangre pico de oligómero antisentido de al menos 200-400 nM.

- 25 En un aspecto adicional de esta realización, un oligonucleótido antisentido de morfolino debe administrarse a intervalos regulares durante un periodo de tiempo corto, por ejemplo, a diario durante dos semanas o menos. Sin embargo, en algunos casos el oligómero antisentido debe administrarse de forma intermitente a lo largo de un periodo de tiempo mayor. La administración de un oligómero antisentido de morfolino a un sujeto también puede venir seguida, o ser concurrente, a la administración de un antibiótico u otro tratamiento terapéutico.

- 30 En un aspecto del método, el sujeto es un sujeto humano, por ejemplo un paciente diagnosticado con una infección bacteriana sistémica o localizada. La condición de un paciente también puede dictar la administración profiláctica de un oligómero antisentido de la invención o de una vacuna bacteriana tratada con oligómero antisentido, por ejemplo en el caso de un paciente que (1) esté inmunocomprometido; (2) sea una víctima de quemaduras; (3) tenga un catéter interno; o (4) esté a punto de someterse, o haya sido sometido recientemente, a cirugía.

- 35 En otra aplicación del método, el sujeto es un animal de granja, por ejemplo un pollo, un pavo, un cerdo, una vaca o una cabra, etc., y el tratamiento es profiláctico o terapéutico. La invención también incluye una composición de pienso para ganado o aves de corral que contiene un grano de pienso suplementado con una cantidad subterapéutica de un compuesto antisentido antibacteriano del tipo descrito anteriormente. También se contempla un método para alimentar ganado y aves de corral con un grano de pienso suplementado con niveles subterapéuticos de un antibiótico, una mejora en la que el grano de pienso está suplementado con una cantidad
- 40 subterapéutica de una composición de oligonucleótido antibacteriana como se ha descrito anteriormente.

Los métodos de la invención son aplicables, en general, al tratamiento de cualquier condición en la que la inhibición o la eliminación del crecimiento de bacterias serían eficaces para producir un resultado terapéutico mejorado para el sujeto en tratamiento.

- 45 Un aspecto de la invención es un método para el tratamiento de una infección bacteriana que incluye la administración de un oligómero antisentido de morfolino a un sujeto, seguido o concurrente a la administración de un antibiótico u otro tratamiento terapéutico del sujeto.

## **B. Métodos de monitorización del tratamiento**

- 50 Debe entenderse que un régimen de tratamiento *in vivo* efectivo que usa compuestos de oligonucleótido antisentido de la invención variará de acuerdo con la frecuencia y la ruta de administración, así como con la condición del sujeto en tratamiento (es decir, administración profiláctica frente a administración en respuesta a una infección localizada o sistémica). Por consiguiente, dicha terapia *in vivo* puede beneficiarse de una monitorización con ensayos apropiados para el tipo particular de infección bacteriana en tratamiento, y un ajuste correspondiente de la dosis o del régimen de tratamiento a fin de lograr un resultado terapéutico óptimo.

La eficacia de un régimen terapéutico dado que implica los métodos descritos en la presente memoria puede

monitorizarse, por ejemplo, mediante indicadores generales de infección tales como recuento sanguíneo completo (CBC, del inglés "complete blood count"), métodos de detección de ácido nucleico, ensayos inmunodiagnósticos o cultivo bacteriano.

5 La identificación y la monitorización de la infección bacteriana generalmente implica uno o más de (1) métodos de detección de ácido nucleico, (2) métodos de detección serológicos, es decir, inmunoensayo convencional, (3) métodos de cultivo, y (4) métodos bioquímicos. Dichos métodos pueden ser cualitativos o cuantitativos.

10 Se pueden diseñar sondas de ácido nucleico en base a secuencias de ácido nucleico bacterianas disponibles públicamente, y usarse para detectar genes o metabolitos (es decir, toxinas) diana, indicativos de infección bacteriana, que pueden ser específicos de un tipo de bacteria particular, por ejemplo, una especie o cepa particular, o común a más de una especie o tipo de bacteria (es decir, bacterias Gram positivas o Gram negativas). También se pueden usar ensayos de amplificación nucleica (por ejemplo, PCR) en dichos métodos de detección.

15 Se puede llevar a cabo una identificación serológica usando una muestra o un cultivo bacteriano aislado de un espécimen biológico, por ejemplo, deposición, orina, fluido cerebroespinal, sangre, etc. El inmunoensayo para la detección de bacterias generalmente se lleva a cabo mediante métodos empleados rutinariamente por los especialistas en la técnica, por ejemplo ELISA o análisis de transferencia Western. Adicionalmente, a menudo se dispone comercialmente de anticuerpos monoclonales específicos de cepas o especies bacterianas concretas.

20 Pueden usarse métodos de cultivo para aislar e identificar tipos particulares de bacterias, empleando técnicas que incluyen, aunque sin limitación, cultivo aeróbico frente a anaeróbico, crecimiento y morfología en varias condiciones de cultivo. Los ejemplos de ensayos bioquímicos incluyen tinción Gram (Gram, 1884; las bacterias Gram positivas se tiñen de azul oscuro y las Gram negativa de rojo), análisis enzimáticos (es decir, oxidasa, catalasa positiva para *Pseudomonas aeruginosa*), y tipo de fagos.

Debe entenderse que la naturaleza exacta de dichos ensayos diagnósticos y cuantitativos, así como otros factores fisiológicos indicativos de infección bacteriana, variarán dependiendo de la diana bacteriana, la afección que se esté tratando y de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.

25 En los casos en los que el sujeto ha sido diagnosticado con un tipo particular de infección bacteriana, el estado de la infección bacteriana también se monitoriza usando las técnicas diagnósticas usadas típicamente por los especialistas en la técnica para monitorizar el tipo particular de infección bacteriana en tratamiento.

30 El régimen de tratamiento con oligómero antisentido puede ajustarse (dosis, frecuencia, ruta, etc.), como se ha indicado, en base a los resultados de los inmunoensayos, otros ensayos bioquímicos y exámenes fisiológicos del sujeto en tratamiento.

De lo anterior, cabe destacar cómo se logran varios objetivos y características de la invención. El método proporciona una mejora en la terapia contra la infección bacteriana, usando secuencias antisentido relativamente cortas para lograr una captación celular aumentada y una mejor acción antibacteriana. Como resultado, la terapia de fármacos es más efectiva y menos cara, tanto en términos de coste como de cantidad de compuesto requerida.

35 Un ventaja importante de la invención es que se pueden diseñar fácilmente compuestos efectivos contra virtualmente cualquier bacteria patógena y evaluarlos, por ejemplo, para una respuesta rápida contra nuevas bacterias resistentes a fármacos, o en casos de bioterrorismo. Una vez que se ha identificado una bacteria diana, los métodos de selección de secuencia descritos permiten identificar fácilmente uno o más genes diana probables, entre un número de genes esenciales, y preparar compuestos antisentido dirigidos contra la diana identificada. Debido a que la evaluación clínica de la seguridad y eficacia, una vez establecidas para un grupo pequeño de compuestos, puede ser extrapolada para virtualmente cualquier nueva diana, se necesita relativamente poco tiempo para afrontar nuevos desafíos de infección bacteriana según van surgiendo.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la invención.

#### **Materiales y métodos**

##### **Oligómeros de fosfordiamidato morfolino**

45 Los PMO se sintetizaron y se purificaron en AVI BioPharma, Inc. (Corvallis, OR) como se ha descrito previamente (Geller, Deere y col., 2003, Summerton y Weller, 1997), se disolvieron en agua, se filtraron a través de una membrana de 0,2 µm (HT Tuffryn®, Gelman Sciences, Inc., Ann Arbor, MI) y se almacenaron a 4°C. Las secuencias de PMO usadas en este estudio se muestran en la Tabla 3. La concentración de PMO se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm y calculando la molaridad usando el coeficiente de extinción apropiado.

#### **Bacterias y condiciones de crecimiento**

Las cepas de bacterias se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) o del *E. coli* Genetic Stock Center de la Universidad de Yale. Todos los experimentos de cultivo puros fueron realizados en placas de 96 pocillos. Las lecturas de DO<sub>600</sub> y la colocación en placa de las células para las determinaciones de CFU/mL fueron realizadas por triplicado.

5 La *Escherichia coli* AS19 y la SM101, que tienen defectos en la síntesis de lipopolisacáridos que producen permeabilidad de la membrana exterior a solutos de alto peso molecular, fueron cultivadas aeróbicamente en caldo LB a 37°C y 30°C, respectivamente. Los transformantes que expresaron pSE380myc-tuc fueron cultivados en LB más 100 µg/mL de ampicilina.

10 La *E. coli* AS19 y la SM105 fueron cultivadas en caldo LB (suplementado con 100 µg/mL de ampicilina para los transformantes que expresaban luciferasa) hasta una DO<sub>600</sub> = 0,12, fueron centrifugadas (4.000 x g, 10 minutos, 20°C) y resuspendidas en mucina al 5% (tipo II, Sigma Chemical Co., St. Louis) en PBS hasta las siguientes concentraciones finales: AS19, 1,5 x 10<sup>8</sup> CFU/mL; SM105, 5,7 x 10<sup>7</sup> CFU/mL; AS19 (pT7myc-luc), 7,2 x 10<sup>9</sup> CFU/mL.

### Gen indicador

15 Se usaron procedimientos de biología molecular estándar para todas las construcciones. Todas las construcciones fueron secuenciadas. Previamente se construyeron dos sistemas indicadores (pT7myc-luc y pSE380myc-luc) para la inhibición antisentido como se ha descrito (Geller, Deere y col., 2003) fusionando 30 pb del extremo 5' de *c-myc* humano a todo el gen de luciferasa (*luc*) excepto al codón de inicio. Las construcciones fueron transformadas por separado en *E. coli* SM101 y AS19.

20 El indicador *acpP-luc* (pCN*acpP-luc*) se preparó ligando un fragmento de restricción *Sall-NotI* de *luc* con el fragmento *Sall-NotI* de pCiNeo (Promega Corp., Madison, WI), eliminando la adenosina del codón de inicio mediante mutagénesis dirigida a sitio, y a continuación clonando direccionalmente un fragmento sintético de *acpP* (pb -17 a +23, ambas incluidas, en donde +1 es la adenosina del codón de inicio) entre los sitios *NheI-Sall*. El pCNmyc-luc se preparó del mismo modo, excepto porque se clonó la secuencia de *myc* entre -14 y +16, ambos inclusive (numerando la adenosina del codón de inicio como +1) en lugar de *acpP* en los sitios *NheI-Sall*. La actividad enzimática de luciferasa se midió en las bacterias como se ha descrito (Geller, Deere y col., 2003).

### Síntesis de proteínas libre de células

30 Se llevaron a cabo reacciones de síntesis de proteínas libres de células bacterianas mezclando los reactivos sobre hielo según las instrucciones del fabricante (Promega Corp.). Las reacciones se programaron con plásmido pT7myc-luc en una reacción transcripción/traducción acoplada o con ARNm sintetizado en una reacción de síntesis de ARN libre de células (Ambion, Inc., Austin, TX, MEGAscript T7 High Yield Transcription Kit) programada con pT7myc-luc. Todas las reacciones de *acp-luc* fueron programadas con pCN*acpP-luc*. Donde se indique, las reacciones libres de células consistían en lisato de reticulocitos de conejo, como describe el fabricante (Promega Corp.). El PMO se añadió hasta una concentración final de 100 nM o de 200 nM, como se indica. Tras 1 h a 37°C, las reacciones fueron enfriadas en hielo y se midió la luciferasa como se ha descrito (Geller, Deere y col., 2003).

### Cultivo de tejido de mamífero

40 Se transfectaron células HeLa en matraces de cultivo de tejido T75 (Nalge Nunc, Inc., Rochester, NY) con un plásmido indicador de luciferasa (pCNmyc-luc) usando Reactivo de Lipofectamina (Gibco BRL, Grand Island, NY) según el manual de usuario en medio libre de suero (Gibco, Inc., Carlsbad, CA, Opti-MEM1) durante 5 horas antes de la re-adición de medio de crecimiento (Hyclone, Inc., Logan, UT, HyQ DME/F12 suplementado con Suero Bovino Fetal al 10% y Gibco Antibiotic-Antimycotic 15240-062) a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%. Después de 24 horas, las células fueron agrupadas y se añadieron 1 x 10<sup>8</sup> a cada pocillo de una placa de 6 pocillos (BD Biosciences, San Jose, CA) en 2 mL de medio de crecimiento. Después de otras 24 horas, se añadió el PMO hasta una concentración final de 10 µM en 2 mL de medio de crecimiento fresco, y las células fueron rascadas de la superficie de la placa con un guardia de goma para administrar el PMO a la célula como se ha descrito previamente (Partridge, Vincent y col., 1996).

45 Después de rascar-cargar, las células fueron transferidas a placas de 6 pocillos e incubadas a 37°C hasta el momento del ensayo. A las 7 y a las 24 horas las células fueron examinadas mediante microscopía para verificar que cada cultivo tenía el mismo número de células, se cosecharon mediante centrifugación y se lisaron en Promega Cell Culture Lysis Reagent (Promega Corp.). Se midió la luciferasa mezclando el lisato celular con Luciferase Assay Reagent (Promega Corp.) y leyendo la emisión de luz en un luminómetro Modelo TD-20e (Turner Designs, Inc., Mountain View, CA).

### Estructura secundaria de ARN

Se usó el algoritmo de plegamiento de ARN M-Fold© (Zuker, 2003) para predecir la estructura secundaria de las bases 1-120 ó 90-1745 del ARNm transcrito a partir de pT7myc-luc. La estructura plegada de las bases 1-120 tenía

un mínimo de  $\Delta G = -6,5$  kcal/mol, y la de las bases 90-1745 fue de  $\Delta G = -452,28$  kcal/mol. Cada PMO fue puntuado (referido con 2ª puntuación) calculando la fracción de bases (en el PMO) que son complementarias a regiones de cadena doble (dúplex) dentro del ARNm diana plegado. Por ejemplo, el PMO 331 (Tabla 4, SEC ID N°: 80) tiene 10 bases de longitud y es complementaria a una región de ARNm myc-luc que, según la predicción de M-fold, forma ARN dúplex en 4 de sus 10 bases (las otras 6 bases no están emparejadas). La 2ª puntuación para el PMO 331 por tanto sería 4 bases/10 bases = 0,400.

### Animales

Se usaron ratones Swiss Webster hembra de 6 a 8 semanas (Simonsen Labs, Inc., Gilroy, CA) en todos los experimentos excepto en uno, aunque se obtuvieron resultados idénticos con machos. La infección se estableció como se ha descrito (Frimodt-Moller, Knudsen y col., 1999). Todos los ratones fueron inyectados IP con 0,1 mL de bacterias resuspendidas en mucina al 5% en PBS, a continuación fueron inyectados inmediatamente IP con 0,1 mL de PMO (3,0 mg/mL) o con PBS. A diversos tiempos después de la infección (tal como se indica en las figuras), grupos (n = 3 a 5) de ratones fueron inyectados IP con 2,0 mL de PBS, y sus abdómenes fueron masajeados suavemente durante 2 minutos. Se retiró el lavado peritoneal y se almacenó en hielo durante ~1 h. Los lavados fueron diluidos en PBS y llevados a placa por triplicado en LB para determinar la CFU.

### Luciferasa y análisis de transferencia Western

Se centrifugaron (10.000 x g, 2 minutos, 4°C) lavados peritoneales (1,00 mL) procedentes de ratones infectados con AS19 (pT7myc-luc) y se desecharon los sobrenadantes. Las partículas fueron resuspendidas en 50  $\mu$ L de PBS. Se mezcló una alícuota de células resuspendidas con un volumen igual de reactivo de lisis de cultivo celular 2x (Promega, Inc., Madison, WI) y se congelaron a -85°C. Los lisatos congelados fueron descongelados y se midió la producción de luz de luciferasa por duplicado en un luminómetro como se ha descrito (Geller, Deere y col., 2003). Se mezcló una segunda alícuota de suspensión celular con tampón de muestra de SDS 2x y se analizó mediante transferencia Western usando un gradiente de 4-20% de Gene Mate Express Gels (ISC BioExpress, Inc., Kaysville, UT). Se prepararon manchas con anticuerpos primarios para luciferasa (Cortex Biochemical, San Leandro, CA) o antisueros para OmpA (Geller y Green, 1989), conjugado de peroxidasa de rábano-IgG anti-conejo de cabra (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), y ECL Western Blotting Reagent (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra). Se escanearon los negativos de película y se digitalizaron en una Kodak Image Station 440 CF. Se calculó la intensidad neta de cada banda sustrayendo la intensidad de ruido de fondo medio. Se normalizó la proteína de luciferasa respecto a OmpA dividiendo la intensidad neta de la banda de luciferasa por la intensidad neta de la banda de OmpA en la misma muestra. El % de inhibición se calculó sustrayendo la media de luciferasa/OmpA de ratones tratados con PMO luc de la media de luciferasa/OmpA de ratones tratados con PMO de no sentido, dividiendo la diferencia por la media de luciferasa/OmpA de ratones tratados con PMO de no sentido, y multiplicando entonces por 100%.

### Análisis estadístico

Se usó la correlación de orden-rango de Spearman para analizar las correlaciones entre los efectos inhibidores de PMO y el contenido de G + C o la puntuación de estructura secundaria de cada PMO. Se usó el ensayo de una cola no paramétrico de Mann-Whitney para analizar las medias de grupo de tratamiento.

### Secuencias de oligómero

Ejemplos de oligómeros dirigidos usados para describir la presente invención se enumeran a continuación en la Tabla 4. Los oligómeros enumerados están dirigidos todos contra *E. coli*, la cepa bacteriana experimental usada en los experimentos como apoyo a la invención.

Tabla 4. Secuencias de PMO

PMO N°	Secuencia (5' a 3')	%GC	2ª Puntuación	Diana	SEC ID N°
328	ACG TTG A	43	0	<i>myc-luc</i>	59
327	ACG TTG AG	50	0	<i>myc-luc</i>	60
326	ACG TTG AGG	56	0	<i>myc-luc</i>	61

ES 2 367 289 T3

PMO Nº	Secuencia (5' a 3')	%GC	2ª Puntuación	Diana	SEC ID Nº
208	ACG TTG AGG G	60	0	<i>myc-luc</i>	62
340	ACG TTG AGG GG	64	0	<i>myc-luc</i>	63
298	ACG TTG AGG GGC	67	0	<i>myc-luc</i>	64
250	ACG TTG AGG GGC <b>A</b>	62	0	<i>myc-luc</i>	65
249	ACG TTG AGG GGC <b>AT</b> <sup>3</sup>	57	0	<i>myc-luc</i>	66
248	ACG TTG AGG GGC <b>ATC</b>	60	0	<i>myc-luc</i>	67
247	ACG TTG AGG GGC <b>ATC</b> G	62	0,0625	<i>myc-luc</i>	68
246	ACG TTG AGG GGC <b>ATC</b> GT	59	0,1176	<i>myc-luc</i>	69
245	ACG TTG AGG GGC <b>ATC</b> GTC	61	0,1667	<i>myc-luc</i>	70
126	ACG TTG AGG GGC <b>ATC</b> GTC	65	0,2000	<i>myc-luc</i>	71
239	G TTG AGG GGC <b>ATC</b> GTC GC	67	0,2222	<i>myc-luc</i>	72
240	TTG AGG GGC <b>ATC</b> GTC GC	65	0,2353	<i>myc-luc</i>	73
241	TG AGG GGC <b>ATC</b> GTC GC	69	0,2500	<i>myc-luc</i>	74
242	G AGG GGC <b>ATC</b> GTC GC	73	0,2667	<i>myc-luc</i>	75
243	AGG GGC <b>ATC</b> GTC GC	71	0,2857	<i>myc-luc</i>	76
244	GG GGC <b>ATC</b> GTC GC	77	0,3077	<i>myc-luc</i>	77
329	G GGC <b>ATC</b> GTC GC	75	0,3333	<i>myc-luc</i>	78
330	GGC <b>ATC</b> GTC GC	73	0,3636	<i>myc-luc</i>	79
331	GC <b>ATC</b> GTC GC	70	0,4000	<i>myc-luc</i>	80
332	C <b>ATC</b> GTC GC	67	0,4444	<i>myc-luc</i>	81
333	<b>ATC</b> GTC GC	62	NC <sup>4</sup>	<i>myc-luc</i>	82
334	TC GTC GC	71	NC	<i>myc-luc</i>	83
341	GGA AAC CGT TGT GGT CTC	60	0,7500	<i>myc-luc 5'</i>	84
342	AC CGT TGT GGT CTC CC	62	0,6875	<i>myc-luc 5'</i>	85
343	GT TGT GGT CTC CC	69	0,6154	<i>myc-luc 5'</i>	86

ES 2 367 289 T3

PMO Nº	Secuencia (5' a 3')	%GC	2ª Puntuación	Diana	SEC ID Nº
344	GT GGT CTC CC	70	0,8000	<i>myc-luc</i> 5'	87
345	CGT CGC GGG ATT CCT TCT	61	0,3889	RBS & 3' de	88
346	AAA GTT AAA CAA AAT TAT	11	0,1667	5' de RBS	89
347	TCC TTC TTA AAG TTA AAC	28	0,3333	RBS & 5' de	90
356	CGT TGA GGG <b>G</b>	70	0	<i>myc-luc</i>	91
357	GT TGA GGG <b>GC</b>	70	0	<i>myc-luc</i>	92
358	<b>T</b> TGA GGG <b>GCA</b>	60	0	<i>myc-luc</i>	93
359	TGA GGG <b>GCA T</b>	60	0	<i>myc-luc</i>	94
360	GA GGG <b>GCA TC</b>	70	0	<i>myc-luc</i>	95
361	A GGG <b>GCA TCG</b>	70	0,1000	<i>myc-luc</i>	96
362	GGG <b>GCA TCG T</b>	70	0,2000	<i>myc-luc</i>	97
363	GG <b>GCA TCG TC</b>	70	0,3000	<i>myc-luc</i>	98
364	G <b>GCA TCG TCG</b>	70	0,4000	<i>myc-luc</i>	99
214	AAT AGG GTT GG	45	0	<i>luc,</i>	100
215	TTT GCA ACC CC	55	0,9091	<i>luc,</i>	101
143	ATC CTC CCA ACT TCG ACA TA	45	NC	No sentido	102
371	TGC CGA GCA CCG GCT TCA	60	NC	No sentido	103
373	TCC ACT TGC C	60	NC	No sentido	104
62-1	TTC TTC GAT AGT GCT <b>CAT AC</b>	40	NC	<i>acpP</i>	105
62-2	TC TTC GAT AGT GCT <b>CAT A</b>	39	NC	<i>acpP</i>	106
62-3	C TTC GAT AGT GCT <b>CAT</b>	44	NC	<i>acpP</i>	107
62-4	TC GAT AGT GCT C <b>AT</b>	43	NC	<i>acpP</i>	108
169	C TTC GAT AGT G	45	NC	<i>acpP</i>	109
379	TTC GAT AGT G	40	NC	<i>acpP</i>	110
380	TTC GAT AGT	33	NC	<i>acpP</i>	111

PMO Nº	Secuencia (5' a 3')	%GC	2ª Puntuación	Diana	SEC ID Nº
381	TC GAT AGT	38	NC	<i>acpP</i>	112
382	TC GAT AG	43	NC	<i>acpP</i>	113
383	C GAT AG	50	NC	<i>acpP</i>	114
62-5	TTG TCC TGA ATA TCA CTT CG	40	NC	No sentido	115
62-7	G TCC TGA ATA TCA CTT	38	NC	No sentido	116
62-8	TCG TGA GTA TCA CT	43	NC	No sentido	117
170	TCT CAG ATG GT	45	NC	No sentido	118
384	AAT CGG A	43	NC	No sentido	119
	ACG TTG AGG C	60	NC	<i>luc</i>	120
	TCC ACT TGC C	60	NC	<i>luc</i>	121
13	TTC CAT TGG TTC AAA CAT AG	35	NC	<i>FtsZ</i>	122
162	C CAT TGG TTC	50	NC	<i>FtsZ</i>	123
17	CTC TCG CAA GGT CGC TCA	60	NC	<i>GyrA</i>	124
164	CTC TCG CAA GG	70	NC	<i>GyrA</i>	125

### **Ejemplo 1: Actividad antisentido en función de la longitud y la posición de la diana**

- 5 Los PMO (Tabla 4) de varias longitudes (entre 7 y 20 bases) que son complementarios a la región en torno al codón de inicio de ARNm *myc-luc* se añadieron a cultivos de crecimiento de *E. coli* SM101 (pSE380myc-luc). Se construyó una serie de PMO reduciendo la longitud en el extremo 3' (SEC ID Nº: 59-71), y otra reduciendo la longitud en el extremo 5' (SEC ID Nº: 71-83). Tras 8 h en cultivo, se midió la luciferasa. Comparado con un cultivo sin PMO, el PMO truncado en 3' inhibió la luciferasa entre el 16 y el 95% (Figura 4, barras rayadas), y el PMO truncado en 5' inhibió la luciferasa entre 6 y 89% (Figura 4, barras rellenas). Los resultados se han discutido antes.
- 10 Se añadieron PMO de las mismas dos series individualmente a reacciones de síntesis de proteínas libres de células bacterianas programadas para expresar *myc-luciferasa*. Estos experimentos fueron diseñados para eliminar los efectos de entrada del PMO en la célula, y para evaluar el PMO a 37°C en lugar de a la temperatura permisiva de crecimiento (30°C) del mutante condicional SM101. El PMO truncado en el extremo 3' de entre 10 y 20 bases de longitud inhibió aproximadamente lo mismo (Figura 5, barras rayadas). Los resultados se han discutido antes.
- 15 Se añadió una serie de PMO isométricos (de 10 bases), que variaban en una base a cada extremo (Tabla 4, SEC ID Nº: 91-99), y se dirigieron a la región en torno al codón de inicio AUG de *myc-luc*, a reacciones libres de células programadas para sintetizar *myc-luc*. Todos los PMO inhibieron la expresión de luciferasa (Figura 6). Se observó una tendencia evidente hacia más inhibición según la posición diana se movía en dirección 3' del codón de inicio. No había correlación entre la inhibición y la inclusión del codón anti-inicio dentro de la secuencia de PMO.
- 20 Se dirigieron PMO de varias longitudes contra varias posiciones dentro del transcrito de *myc-luc*, que incluye el extremo 5' del transcrito (PMO 341-344, SEC ID Nº: 84-87), el sitio de unión de ribosoma (PMO 345 y 347, SEC ID Nº: 88 y 90), la región por encima del sitio de unión de ribosoma (PMO 346, SEC ID Nº: 89), la región en torno e inmediatamente por debajo del codón de inicio (PMO 126, SEC ID Nº: 71), y la región codificadora 3' de luciferasa (PMO 214 y 215, SEC ID Nº: 100 y 101). Se añadió cada PMO a una reacción de síntesis de proteínas libre de

células bacterianas con ARNm de *myc-luc*, y se midió la producción de luz después de 1 h a 37°C. Los resultados muestran que sólo el PMO 126 inhibió significativamente (Figura 7). Los controles de secuencia de base de no sentido de 10 y 20 bases de longitud inhibieron un 4 y un 6%, respectivamente.

5 El análisis estadístico de todos los PMO dirigidos a *myc-luc*, o solo de la serie isométrica de 10 bases, no indicó correlación ( $r = -0,09785$ ,  $P = 0,5428$ , y  $r = -0,4572$ ,  $P = 0,1912$ , respectivamente) entre la inhibición en las reacciones libres de células y el porcentaje de contenido de C + G. Sin embargo, un análisis de 37 PMO de *myc* (Figura 8A), excluyendo los más cortos de 9 bases (327, 328, 333 y 334, SEC ID N°: 60, 59, 82 y 83) y los de la región codificadora 3' de Luc (214 y 215), reveló una correlación negativa significativa ( $r = -0,8497$ ,  $P < 0,0001$ ) entre la inhibición de expresión de indicador y la 2ª puntuación del PMO (Tabla 1). La 2ª puntuación es la fracción de bases del PMO que son complementarias a la estructura secundaria de doble cadena dentro del ARNm diana plegado (Zuker, 2003). Un análisis de todos los PMO de 10 bases dirigidos a *myc-luc* también mostró una correlación negativa significativa ( $r = -0,9067$ ,  $P = 0,0003$ ) entre la inhibición y la 2ª puntuación (Figura 8B).

15 El trabajo previo en sistemas eucarióticos sugiere que los PMO de 13-14 subunidades de longitud son ineficaces. Nosotros tratamos cultivos de células HeLa que expresaban *myc-luc* con PMO *myc* 10  $\mu$ M de 2 longitudes (11 y 20 bases, PMO 340 y 126, SEC ID N°: 63 y 71). La luciferasa se midió a las 7 y a las 24 horas después del tratamiento. Los resultados muestran que ambos PMO inhibieron la expresión de luciferasa (Figura 11). El PMO de 11 bases inhibió casi tan bien como el PMO de 20 bases a las 7 horas, pero el PMO de mayor longitud inhibió mejor a las 24 h. La inhibición no específica fue inferior en ambos tiempos, tal como indica el cultivo tratado con el PMO no sentido 143 (SEC ID N°: 102).

20 La serie truncada en 3' de PMO *myc* fue evaluada para la inhibición de luciferasa en una reacción de traducción de proteínas libre de células llevada a cabo con componentes eucarióticos (reticulocitos de conejo). El PMO de 20 bases inhibió significativamente más que el PMO de menor longitud (Figura 12). Se produjo un descenso pronunciado de la inhibición entre el PMO de 20 bases y el de 18 bases. Se observó una tendencia de inhibición que generalmente favorecía al PMO de mayor longitud.

25

### **Ejemplo 2: Proteína portadora de acilo como diana génica bacteriana endógena**

30 Se evaluó el efecto del PMO sobre un gen bacteriano endógeno que codifica proteína portadora de acilo, *acpP*, que es esencial para la viabilidad (Zhang y Cronan, 1996) y que ha sido usada previamente para inhibir el crecimiento bacteriano (Good, Awasthi y col., 2001; Geller, Deere y col., 2003). Se añadieron PMO entre 6 y 20 bases de longitud y complementarios a la región en torno al codón de inicio del ARNm para *acpP* (Tabla 3, SEC ID N°: 105-114) a cultivos en crecimiento de AS19, y se monitorizó el crecimiento a 37°C mediante densidad óptica y recuento de células viables. Las curvas de crecimiento fueron normales para todos los cultivos excepto para el del PMO de 11 bases, que provocó una inhibición significativa (Figura 9A). En los cultivos con los PMO de 10 y 14 bases se observaron inhibiciones de DO ligeras y reproducibles, pero estadísticamente significativas. Las células viables se vieron reducidas significativamente en cultivos de 8 h que contenían PMO de 10, 11 ó 14 bases (Figura 9B). No se observó ninguna reducción en la CFU de los cultivos tratados con PMO de menos de 10 bases o de más de 14 bases de longitud. Los cultivos sin PMO, o con una secuencia de bases de no sentido, no inhibieron el crecimiento.

40 Se añadieron PMO de varias longitudes (entre 6 y 20 bases) y dirigidos contra *acpP* a reacciones de síntesis de proteínas libres de células bacterianas programadas para expresar un indicador de *acpP-luc*. Los resultados (Figura 10) muestran que los PMO de 11 a 20 bases de longitud inhibieron la expresión de indicador aproximadamente en la misma medida. Los PMO de menos de 11 bases de longitud, o los controles de secuencia de no sentido, no inhibieron significativamente.

### **Ejemplo 3: Actividad antibacteriana antisentido *in vivo***

45 Se inyectaron grupos de 4 ratones IP con *E. coli* AS19, que tiene un defecto genético que la hace anormalmente permeable a solutos de alto PM. Inmediatamente después de la infección, se inyectó IP a cada ratón con 300  $\mu$ g de un PMO de 11 bases complementario a *acpP*, un PMO de secuencia de no sentido de 11 bases o PBS.

50 Se recolectaron los lavados peritoneales a las 2, 7, 13 y 23 h de la infección, y se llevaron a placa para determinar bacterias. Los resultados muestran que para todos los tiempos analizados, los ratones tratados con PMO *acpP* presentaron CFU significativamente ( $P < 0,05$ ) inferiores a las de los ratones tratados con PMO de no sentido con PBS (Figura 13). Las diferencias entre el grupo tratado con PMO *acpP* y el control de PMO de no sentido oscilan entre 1/39 a las 2 h y 1/600 a las 23 h.

Se evaluó de nuevo los mismos PMO, excepto que con *E. coli* SM105, que tiene una membrana exterior normal. El PMO *acpP* redujo la CFU en un 84% en comparación con el PMO de no sentido a las 12 h de la infección. No se produjo reducción de CFU a las 2, 6 ó 24 h (Figura 14). Los ratones fueron inyectados con una segunda dosis a las

24 h de la infección. A las 48 h de la infección la CFU de los ratones tratados con *acpP* era un 70% inferior a la CFU de los ratones tratados con PMO de no sentido (Figura 14).

5 Los resultados anteriores con PMO *acpP* y de no sentido sugieren que la inhibición fue específica de secuencia. Para demostrar directamente un efecto específico de secuencia, se infectaron ratones con *E. coli* AS19 que expresa luciferasa de luciérnaga, a continuación se trataron a las 0 y las 13 h después de la infección con un PMO (luc) complementario a la región en torno al codón de inicio del transcrito de luciferasa, o un PMO de no sentido. Se recolectaron los lavados peritoneales a las 13 y 22 h después de la infección y se analizaron para determinar la CFU, la actividad de luciferasa y la luciferasa y proteína OmpA (inmunoanálisis de transferencia Western). Como era de esperar, los resultados no muestran ninguna inhibición de crecimiento con el tratamiento de PMO luc en comparación con el tratamiento de PMO de no sentido (Tabla 4). La actividad de luciferasa de las muestras de ratones tratados con PMO luc se inhibió en un 53% y un 46%, a 13 y 22 h respectivamente, en comparación con los ratones tratados con PMO de no sentido (Tabla 4).

10 El análisis de transferencia Western coincidió estrechamente con los resultados de actividad de luciferasa. En las muestras de ratones tratados con PMO luc se observó una reducción del 68% y del 47% en la cantidad de proteína de luciferasa a 13 y 22 h, respectivamente, en comparación con las muestras procedentes de ratones tratados con PMO de no sentido (Tabla 2).

Tabla 4. Inhibición específica de gen

PMO de tratamiento	Tiempo tras tratamiento (h)	CFU/ ml (x 10 <sup>6</sup> )	Actividad de luciferasa			Transferencia Western		
			RLU/CFU Media (SEM) n = 8	P	% de inhibición	Luc/OmpA Media (SEM) n = 7-8	P	% de inhibición
Luc	13	6,3	2,90 (0,629)	0,0035	53	0,122 (0,0312)	0,0002	68
No sentido	13	4,3	6,19 (0,773)		0	0,382 (0,0296)		0
Luc	22	0,96	3,20 (0,582)	0,0093	46	0,147 (0,0363)	0,0145	57
No sentido	22	0,39	8,12* (1,94)		0	0,339 (0,0668)		0

20

#### Listado de secuencias:

Nombre	Secuencia (de 5' a 3')	SEC ID N°
<i>E. coli</i> <i>ftsZ</i>	GAGAGAACTATGTTTGAACCAATGGAAGCTT	1
<i>E. coli</i> <i>acpP</i>	ATTTAAGAGTATGAGCACTATCGAAGAACGC	2
<i>E. coli</i> <i>gyrA</i>	TAGCGGTTAGATGAGCGACCTTGCGAGAGAA	3
<i>E. coli</i> O 157:H7 <i>ftsZ</i>	GAGAGAACTATGTTTGAACCAATGGAAGCTT	4
<i>E. coli</i> O157:H7 <i>acpP</i>	ATTTAAGAGTATGAGCACTATCGAAGAACGC	5
<i>E. coli</i> O157:H7 <i>gyrA</i>	TAGCGGTTAGATGAGCGACCTTGCGAGAGAA	6

ES 2 367 289 T3

Nombre	Secuencia (de 5' a 3')	SEC ID N°
<i>S. typhimurium</i> ftsZ	GAGAGAGATTATGTTTGAACCTATGGAECTA	7
<i>S. typhimurium</i> acpP	ATTTAAGAGTATGAGCACTATCGAAGAACGC	8
<i>S. typhimurium</i> gyrA	TAGCGGTTAGATGAGCGACCTTGCGAGAGAA	9
<i>S. aeruginosa</i> ftsZ	GAGAGGGGAAATGTTTGAACCTGGTCGATAAC	10
<i>S. aeruginosa</i> acpP	AAAACAAGGTATGAGCACCATCGAAGAACGC	11
<i>S. aeruginosa</i> gyrA	CAGGCTTCTCATGGGCGAACTGGCCAAAGAA	12
<i>V. cholera</i> ftsZ	GAGATAACACATGTTTGAACCGATGATGGAA	13
<i>V. cholera</i> acpP	ACTATATTGGATGGTTTATATGTCTATCTCT	14
<i>V. cholera</i> gyrA	TAATGGCTCTATGAGCGATCTAGCTAAAGAG	15
<i>N. gonorrhoea</i> ftsZ	GAGTTTTTGAATGGAATTTGTTTACGACGT	16
<i>N. gonorrhoea</i> acpP	AACGACTGATATGTCAAACATCGAACAACA	17
<i>N. gonorrhoea</i> gyrA	CATTGAAACCATGACCGACGCAACCATCCG	18
<i>S. aureus</i> ftsZ	GGAAATTTAAATGTTAGAAATTTGAACAAGGA	19
<i>S. aureus</i> gyrA	GGAECTTGTGATGGCTGAATTACCTCAATCA	20
<i>S. aureus</i> fmhB	ATCATAAATCATGGAAAAGATGCATATCAC	21
<i>M. tuberculosis</i> ftsZ	CTCTAAGCCTATGGTTGAGGTTGAGAGTTTG	22
<i>M. tuberculosis</i> acpP	CCCGGGCGCGATGTGGCGATATCCACTAAGT	23
<i>M. tuberculosis</i> gyrA	CGAGGAATAGATGACAGACACGACGTTGCCG	24
<i>M. tuberculosis</i> pimA	GGAAAGCCTGATGCGGATCGGCATGATTTG	25
<i>M. tuberculosis</i> cysS2	CTGGCACGTCGTGACCGATCGGGCTCGCTT	26
<i>H. pylori</i> ftsZ	GAATGTGGCTATGGTTCATCAATCAGAGATG	27
<i>H. pylori</i> acpP	AGTTTTAATTATGGCTTTATTTGAAGATATT	28
<i>H. pylori</i> gyrA	AGGGAGACACATGCAAGATAATTCAGTCAAT	29
<i>S. pneumoniae</i> ftsZ	AAAATAAATTATGACATTTTCATTTGATACA	30
<i>S. pneumoniae</i> acpP	GAGTCCTATCATGGCAGTATTTGAAAAAGTA	31

ES 2 367 289 T3

Nombre	Secuencia (de 5' a 3')	SEC ID N°
<i>S. pneumoniae</i> gyrA	GCATTTATTAATGCAGGATAAAAAATTTAGTG	32
<i>T. palladium</i> ftsZ	TGGGAGGGGAATGATGAATATAGAGCTTGCA	33
<i>T. palladium</i> acpP	TGCCCCGTGGATGAGTTGTTCTTAAGAATGA	34
<i>T. palladium</i> gyrA	TGCCCGCCCTATGGAAGAAATTAGCACCCCA	35
<i>C. trachomatis</i> acpP	GGATCATAGGATGAGTTTAGAAGATGATGTA	36
<i>C. trachomatis</i> gyrA	AAACGAACTTATGAGCGACCTCTCGGACCTA	37
<i>B. henselae</i> ftsZ	AGGCAAATTAATTGGTAAAAAATTAGAGAG	38
<i>B. henselae</i> acpP	GGATTTCAACATGAGTGATACAGTAGAGCG	39
<i>B. henselae</i> gyrA	GTCTAAAGCTGTGACAGATCTAAACCCGCA	40
<i>H. influenza</i> ftsz	GAGAACATCAATGCTATACCCAGAGTACCCT	41
<i>H. influenza</i> acpP	GGAAAAACAAATGAGTATTGAAGAACGCGTG	42
<i>H. influenza</i> gyrA	AGGAATACCAATGACGGATTCAATCCAATCA	43
<i>Y. pestis</i> ftsZ	GAGAGAACTATGTTTGAACCTATGGAACT	44
<i>Y. peStis</i> acpP	ATTTAAGAGTATGAGCACTATCGAAGAACG	45
<i>Y. pestis</i> gyrA	TAGCGGCTCAATGAGCGACCTTGCCAGAGA	46
<i>B. anthracis</i> ftsZ	GGATTTGACATGTTAGAGTTTGATACTAC	47
<i>B. anthracis</i> acpP	GGTGAATGGAATGGCAGATGTTTTAGAGCG	48
<i>B. anthracis</i> gyrA	GTGCTCGTTGATGTCAGACAATCAACAACA	49
<i>B. mallei</i> ftsZ	GGAGGCAACAATGGAATTCGAAATGCTGGA	50
<i>B. mallei</i> acpP	CGGAGGGGTAATGGACAACATCGAACAACG	51
<i>B. mallei</i> gyrA	ATACGGATACATGGATCAATTCGCCAAAGA	52
<i>B. pseudomallei</i> ftsZ	GGAGGCAACAATGGAATTCGAAATGCTGGA	53
<i>B. pseudomallei</i> acpP	CGGAGGGGTAATGGACAACATCGAACAACG	54
<i>B. pseudomallei</i> gyrA	ATACGGATACATGGATCAATTCGCCAAAGA	55
<i>F. tularensis</i> ftsZ	GGAGTAAAATATGTTTGATTTTAACGATTC	56

ES 2 367 289 T3

Nombre	Secuencia (de 5' a 3')	SEC ID N°
<i>F. tularensis</i> acpP	GGAAAAAATATGAGTACACATAACGAAGA	57
<i>F. tularensis</i> gyrA	GCGATAACTAATGTCTATAATTACTAAAGA	58
328	ACGTTGA	59
327	ACGTTGAG	60
326	ACGTTGAGG	61
208	ACGTTGAGGG	62
340	ACGTTGAGGGG	63
298	ACGTTGAGGGGC	64
250	ACGTTGAGGGGCA	65
249	ACGTTGAGGGGCAT	66
248	ACGTTGAGGGGCATC	67
247	ACGTTGAGGGGCATCG	68
246	ACGTTGAGGGGCATCGT	69
245	ACGTTGAGGGGCATCGTC	70
126	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	71
239	GTTGAGGGGCATCGTCGC	72
240	TTGAGGGGCATCGTCGC	73
241	TGAGGGGCATCGTCGC	74
242	GAGGGGCATCGTCGC	75
243	AGGGGCATCGTCGC	76
244	GGGGCATCGTCGC	77
329	GGGCATCGTCGC	78
330	GGCATCGTCGC	79
331	GCATCGTCGC	80
332	CATCGTCGC	81

ES 2 367 289 T3

Nombre	Secuencia (de 5' a 3')	SEC ID N°
333	<b>ATCGTCGC</b>	82
334	<b>TCGTCGC</b>	83
341	GGAAACCGTTGTGGTCTCCC	84
342	ACCGTTGTGGTCTCCC	85
343	GTTGTGGTCTCCC	86
344	GTGGTCTCCC	87
345	CGTCGCGGGATTCTTCT	88
346	AAAGTTAAACAAAATTAT	89
347	TCCTTCTTAAAGTTAAAC	90
356	CGTTGAGGGG	91
357	GTTGAGGGGC	92
358	TTGAGGGGCA	93
359	TGAGGGGCAT	94
360	GAGGGGCATC	95
361	AGGGGCATCG	96
362	GGGGCATCGT	97
363	GGGCATCGTC	98
364	GGCATCGTCG	99
214	AATAGGGTTGG	100
215	TTTGCAACCCC	101
143	ATCCTCCCAACTTCGACATA	102
371	TGCCGAGCACCGGCTTCATA	103
373	TCCACTTGCC	104
62-1	TTCTTCGATAGTGCTCATA	105
62-2	TCTTCGATAGTGCTCATA	106

ES 2 367 289 T3

Nombre	Secuencia (de 5' a 3')	SEC ID N°
62-3	CTTCGATAGTGCTCAT	107
62-4	TCGATAGTGCTCAT	108
169	CTTCGATAGTG	109
379	TTCGATAGTG	110
380	TTCGATAGT	111
381	TCGATAGT	112
382	TCGATAG	113
383	CGATAG	114
62-5	TTGTCCTGAATATCACTTCG	115
62-7	GTCCTGAATATCACTT	116
62-8	TCGTGAGTATCACT	117
170	TCTCAGATGGT	118
384	AATCGGA	119
	ACGTTGAGG C	120
	TCCAATTGC C	121
13	TTCCATTGGTTCAAACATAG	122
162	CCATTGGTTC	123
17	CTCTCGCAAGGTCGCTCATC	124
164	CTCTCGCAAGG	125
<i>E. coli acpP</i>	TGCTCATACTC	126
<i>E. coli acpP</i>	ATAGTGCTCAT	127
<i>E. coli acpP</i>	GCGTTCTTCCG	128

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> AVI BioPharma, Inc.  
Geller, Bruce L.
- 5 Deere, Jesse D.  
Iversen, Patrick L.
- <120> MÉTODO Y COMPUESTO ANTISENTIDO ANTIBACTERIANO  
<130> 504508068wO0  
<150> EE.UU. 60/585.122
- 10 <151> 2004-07-02  
<160> 128  
<170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 15 <211> 31  
<212> ADN  
<213> Escherichia coli
- <400> 1
- 20 gagagaaact atgttgaac caatggaact t 31
- <210> 2  
<211> 31  
<212> ADN
- 25 <213> Escherichia coli
- <400> 2  
atttaagagt atgagcacta tcgaagaacg c 31
- 30 <210> 3  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Escherichia coli
- 35 <400> 3

tagcggtag atgagcgacc ttgcgagaga a 31

<210> 4

<211> 31

5 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 4

gagagaaact atgttgaac caatggaact t 31

10

<210> 5

<211> 31

<212> ADN

<213> Escherichia coli

15

<400> 5

atttaagagt atgagcacta tcgaagaacg c 31

<210> 6

20 <211> 31

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 6

25 tagcggtag atgagcgacc ttgcgagaga a 31

<210> 7

<211> 31

<212> ADN

30 <213> salmonella typhimurium

<400> 7

gagagagatt atgttgaac ctatggaact a 31

35 <210> 8

<211> 31

<212> ADN

<213> Salmonella typhimurium

5 <400> 8

atttaagagt atgagcacta tcgaagaacg c 31

<210> 9

<211> 31

10 <212> ADN

<213> salmonella typhimurium

<400> 9

tagcggtag atgagcgacc ttgcgagaga a 31

15

<210> 10

<211> 31

<212> ADN

<213> Pseudomonas aeruginosa

20

<400> 10

gagaggggaa atgttgaac tggcgcataa c 31

<210> 11

25 <211> 31

<212> ADN

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 11

30 aaaacaaggt atgagcacca tcgaagaacg c 31

<210> 12

<211> 31

<212> ADN

35 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 12

caggcttctc atgggcgaac tggcceaaga a 31

5 <210> 13

<211> 31

<212> ADN

<213> vibrio cholera

10 <400> 13

gagataacac atgttgaac cgatgatgga a 31

<210> 14

<211> 31

15 <212> ADN

<213> vibrio cholera

<400> 14

actatattgg atggttata tgtctatctc t 31

20

<210> 15

<211> 31

<212> ADN

<213> vibrio cholera

25

<400> 15

taatggctct atgagcgatc tagctaaaga g 31

<210> 16

30 <211> 30

<212> ADN

<213> Neisseria gonorhoea

<400> 16

35 gagttttga atggaattg tttacgacgt 30

<210> 17  
<211> 30  
<212> ADN  
5 <213> Neisseria gonorhoea  
  
<400> 17  
aacgactgat atgtcaaaca tcgaacaaca 30  
  
10 <210> 18  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Neisseria gonorhoea  
  
15 <400> 18  
cattgaaacc atgaccgacg caaccatccg 30  
  
<210> 19  
<211> 31  
20 <212> ADN  
<213> Staphylococcus aureus  
  
<400> 19  
ggaaatttaa atgttagaat ttgaacaagg a 31  
25  
<210> 20  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Staphylococcus aureus  
30  
<400> 20  
ggaactcttg atggctgaat tacctcaatc a 31  
  
<210> 21  
35 <211> 30

<212> ADN

<213> Staphylococcus aureus

<400> 21

5 atcataaatc atggaaaaga tgcataatcac 30

<210> 22

<211> 31

<212> ADN

10 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 22

ctctaagcct atggttgagg ttgagagttt g 31

15 <210> 23

<211> 31

<212> ADN

<213> Mycobacterium tuberculosis

20 <400> 23

cccgggcgcg atgtggcgat atccactaag t 31

<210> 24

<211> 31

25 <212> ADN

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 24

cgaggaatag atgacagaca cgacgttgcc g 31

30

<210> 25

<211> 30

<212> ADN

<213> Mycobacterium tuberculosis

35

<400> 25

gaaagcctg atgcgatcg gcatgattg 30

<210> 26

5 <211> 30

<212> ADN

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 26

10 ctggcacgtc gtgaccgatc gggctcgctt 30

<210> 27

<211> 31

<212> ADN

15 <213> Helicobacter pylori

<400> 27

gaatgggct atggtcatc aatcagat g 31

20 <210> 28

<211> 31

<212> ADN

<213> Helicobacter pylori

25 <400> 28

agtttaatt atggctttat ttgaagatat t 31

<210> 29

<211> 31

30 <212> ADN

<213> Helicobacter pylori

<400> 29

aggagacac atgcaagata attcagtaa t 31

35

<210> 30  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Streptococcus pneumoniae  
 5  
 <400> 30  
 aaaataaatt atgacatttt catttgatac a 31  
  
 <210> 31  
 10 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Streptococcus pneumoniae  
  
 <400> 31  
 15 ggtcctatc atggcagtat ttgaaaaagt a 31  
  
 <210> 32  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 20 <213> Streptococcus pneumoniae  
  
 <400> 32  
 gcattatta atgcaggata aaaatttagt g 31  
  
 25 <210> 33  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Treponema palladium  
  
 30 <400> 33  
 tgggagggga atgatgaata tagagcttgc a 31  
  
 <210> 34  
 <211> 31  
 35 <212> ADN

<213> Treponema palladium

<400> 34

tgccccgtgg atgagttgtt ctaagaatg a 31

5

<210> 35

<211> 31

<212> ADN

<213> Treponema palladium

10

<400> 35

tgccccccct atggaagaaa ttagcacccc a 31

<210> 36

15

<211> 31

<212> ADN

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 36

20

ggatcatagg atgagtttag aagatgatgt a 31

<210> 37

<211> 31

<212> ADN.

25

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 37

aaacgaactt atgagcgacc tctcggacct a 31

30

<210> 38

<211> 30

<212> ADN

<213> Bartonella henselae

35

<400> 38

aggcaaatta attggtaaaa aattagagag 30

<210> 39

<211> 30

5 <212> ADN

<213> Bartonella henselae

<400> 39

ggatttcaac atgagtata cagtagagcg 30

10

<210> 40

<211> 30

<212> ADN

<213> Bartonella henselae

15

<400> 40

gtctaaagct gtgacagatc taaaccgca 30

<210> 41

20 <211> 31

<212> ADN

<213> Hemophilus influenza

<400> 41

25 gagaacatca atgctatacc cagagtacc t 31

<210> 42

<211> 31

<212> ADN

30 <213> hemophilus influenza

<400> 42

ggaaaaacaa atgagtattg aagaacgcgt g 31

35 <210> 43

<211> 31

<212> ADN

<213> Hemophilus influenza

5 <400> 43

aggaatacca atgacggatt caatccaatc a 31

<210> 44

<211> 30

10 <212> ADN

<213> Yersinia pestis

<400> 44

gagagaaaact atgtttgaac ctatggaact 30

15

<210> 45

<211> 30

<212> ADN

<213> Yersinia pestis

20

<400> 45

atttaagagt atgagcacta tcgaagaacg 30

<210> 46

25 <211> 30

<212> ADN

<213> Yersinia pestis

<400> 46

30 tagcggctca atgagcgacc ttgccagaga 30

<210> 47

<211> 30

<212> ADN

35 <213> Bacillus anthracis

<400> 47

ggatttcgac atgtagagt ttgatactac 30

5 <210> 48

<211> 30

<212> ADN

<213> Bacillus anthracis

10 <400> 48

ggtgaatgga atggcagatg ttttagagcg 30

<210> 49

<211> 30

15 <212> ADN

<213> Bacillus anthracis

<400> 49

gtgctcgttg atgtagaca atcaacaaca 30

20

<210> 50

<211> 30

<212> ADN

<213> Burkholderia mallei

25

<400> 50

ggaggcaaca atggaattcg aaatgctgga 30

<210> 51

30 <211> 30

<212> ADN

<213> Burkholderia mallei

<400> 51

35 cggaggggta atggacaaca tcgaacaacg 30

<210> 52

<211> 30

<212> ADN

5 <213> Burkholderia mallei

<400> 52

atacggatac atggatcaat tcgccaaga 30

10 <210> 53

<211> 30

<212> ADN

<213> Burkholderia pseudomallei

15 <400> 53

ggaggcaaca atggaattcg aaatgctgga 30

<210> 54

<211> 30

20 <212> ADN

<213> Burkholderia pseudomallei

<400> 54

cggaggggta atggacaaca tcgaacaacg 30

25

<210> 55

<211> 30

<212> ADN

<213> Burkholderia pseudomallei

30

<400> 55

atacggatac atggatcaat tcgccaaga 30

<210> 56

35 <211> 30

<212> ADN

<213> Francisella tularensis

<400> 56

5 ggagtaaaat atgtttgatt ttaacgattc 30

<210> 57

<211> 30

<212> ADN

10 <213> Francisella tularensis

<400> 57

aggaaaaaat atgagtacac ataacgaaga 30

15 <210> 58

<211> 30

<212> ADN

<213> Francisella tularensis

20 <400> 58

gcgataacta atgtctataa ttactaaaga 30

<210> 59

<211> 7

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

30

<400> 59

acgttga 7

<210> 60

35 <211> 8

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Oligómero sintético

<400> 60

acgttgag 8

10 <210> 61

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Oligómero sintético

<400> 61

acgttgagg 9

20

<210> 62

<211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Oligómero sintético

<400> 62 10

30 acgttgagg 10

<210> 63

<211> 11

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

5 <400> 63

acgttgaggg g 11

<210> 64

<211> 12

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

15

<400> 64

acgttgaggg gc 12

<210> 65

20 <211> 13

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Oligómero sintético

<400> 65

acgttgaggg gca 13

30 <210> 66

<211> 14

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Oligómero sintético

<400> 66  
acgttgaggg gcat 14

5

<210> 67  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Oligómero sintético

<400> 67

15 acgttgaggg gcatc 15

<210> 68  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Oligómero sintético

<400> 68

25 acgttgaggg gcatcg 16

<210> 69  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> Oligómero sintético

35

<400> 69

acgttgaggg gcatcgt 17

<210> 70

5 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Oligómero sintético

<400> 70

acgttgaggg gcatcgtc 18

15 <210> 71

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Oligómero sintético

<400> 71

acgttgaggg gcatcgtcgc 20

25

<210> 72

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Oligómero sintético

<400> 72

35 gttgaggggc atcgtcgc 18

<210> 73

<211> 17

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

10 <400> 73

ttgaggggca tcgtcgc 17

<210> 74

<211> 16

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

20

<400> 74

tgaggggcat cgtcgc 16

<210> 75

25 <211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Oligómero sintético

<400> 75

gaggggcatc gtcgc 15

35 <210> 76

<211> 14

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Oligómero sintético

<400> 76

aggggcatcg tcgc 14

10

<210> 77

<211> 13

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Oligómero sintético

<400> 77

20 ggggcatcgt cgc 13

<210> 78

<211> 12

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

30 <400> 78

gggcatcgtc gc 12

<210> 79

<211> 11

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

5

<400> 79

ggcatcgtcg c 11

<210> 80

10 <211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Oligómero sintético

<400> 80

gcatcgtcgc 10

20 <210> 81

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Oligómero sintético

<400> 81

catcgtcgc 9

30

<210> 82

<211> 8

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Oligómero sintético

<400> 82

5 atcgtcgc 8

<210> 83

<211> 7

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

15 <400> 83

tcgtcgc 7

<210> 84

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

25

<400> 84 20

ggaaccggtt gtggtctccc 20

<210> 85

30 <211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Oligómero sintético

<400> 85 16

accgttgagg tctccc 16

5 <210> 86

<211> 13

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Oligómero sintético

<400> 86 13

gttggtgct ccc 13

15

<210> 87

<211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Oligómero sintético

<400> 87

25 gtggtctccc 10

<210> 88

<211> 18

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

35 <400> 88

cgtcgcgga ttccttct 18

<210> 89

<211> 18

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

10

<400> 89

aaagttaaac aaaattat 18

<210> 90

15 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Oligómero sintético

<400> 90

tccttcttaa agttaaac 18

25 <210> 91

<211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Oligómero sintético

<400> 91 10.

cgttgagggg 10

35

<210> 92

<211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Oligómero sintético

<400> 92

10 gttgaggggc 10

<210> 93

<211> 10

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

20 <400> 93

ttgaggggca 10

<210> 94

<211> 10

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

30

<400> 94

tgaggggcat 10

<210> 95

35 <211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Oligómero sintético

<400> 95

gaggggcatc 10

10 <210> 96

<211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Oligómero sintético

<400> 96

aggggcatcg 10

20

<210> 97

<211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Oligómero sintético

<400> 97

30 ggggcatcgt 10

<210> 98

<211> 10

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

5 <400> 98

gggcatcgtc 10

<210> 99

<211> 10

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

15

<400> 99

ggcatcgtcg 10

<210> 100

20 <211> 11

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Oligómero sintético

<400> 100

aatagggttg g 11

30 <210> 101

<211> 11

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Oligómero sintético

<400> 101

ttgcaacc c 11

5

<210> 102

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Oligómero sintético

<400> 102

15 atcctcccaa cttcgacata 20

<210> 103

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

25 <400> 103

tgccgagcac cggcttcata 20

<210> 104

<211> 10

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

35

<400> 104

tccacttgcc 10

<210> 105

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Oligómero sintético

<400> 105

ttcttcgata gtcctacac 20

15 <210> 106

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Oligómero sintético

<400> 106

tcttcgatag tgcctacata 18

25

<210> 107

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Oligómero sintético

<400> 107

35 cttcgatagt gctcat 16

<210> 108

<211> 14

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

10 <400> 108

tcgatagtc tcat 14

<210> 109

<211> 11

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

20

<400> 109

cttcgatag g 11

<210> 110

25 <211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Oligómero sintético

<400> 110

ttcgatagtg 10

35 <210> 111

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Oligómero sintético

<400> 111

ttcgatagt 9

10

<210> 112

<211> 8

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Oligómero sintético

<400> 112

20 tcgatagt 8

<210> 113

<211> 7

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

30 <400> 113

tcgatag 7

<210> 114

<211> 6

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

5

<400> 114  
cgatag 6

<210> 115

10 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Oligómero sintético

<400> 115  
ttgcctgaa tatcacttcg 20

20 <210> 116  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Oligómero sintético

<400> 116  
gtcctgaata tcactt 16

30 <210> 117  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Oligómero sintético

<400> 117

5 tcgtgagtat cact 14

<210> 118

<211> 11

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

15 <400> 118

tctcagatgg t 11

<210> 119

<211> 7

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

25

<400> 119

aatcgga 7

<210> 120

30 <211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Oligómero sintético

<400> 120  
acgttgaggc 10

5 <210> 121  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Oligómero sintético

<400> 121  
tccactgcc 10

15 <210> 122  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Oligómero sintético

<400> 122  
25 ttccattggt tcaaacatag 20

<210> 123  
<211> 10  
<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligómero sintético

35 <400> 123

ccattggttc 10

<210> 124

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligómero sintético

10

<400> 124

ctctcgcaag gtcgctcatc 20

<210> 125

15 <211> 11

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Oligómero sintético

<400> 125

ctctcgcaag g 11

25 <210> 126

<211> 11

<212> ADN

<213> Escherichia coli

30 <400> 126

tgctcact c 11

<210> 127

<211> 11

35 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 127

atagtgtcca t 11

5

<210> 128

<211> 11

<212> ADN

<213> Escherichia coli

10

<400> 128

gcgttctcc g 11

## REIVINDICACIONES

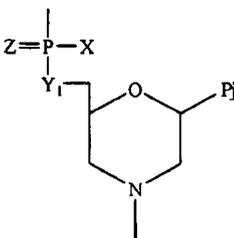
5 1.- Un compuesto de oligonucleótido de morfolino antisentido sustancialmente no cargado para inhibir el crecimiento de células bacterianas patógenas, que consiste en subunidades de morfolino y enlaces intersubunidades que contienen fósforo y que unen un nitrógeno de morfolino de una subunidad con un carbono exocíclico 5' de otra subunidad adyacente, y que tiene:

(i) no más de 12 bases de nucleótido,

10 (ii) una secuencia de ácido nucleico de no menos de 10 bases de longitud dirigida contra un ARNm bacteriano que codifica la proteína acpP, en donde dicha secuencia de ácido nucleico dirigida es complementaria a una secuencia diana que contiene el codón de inicio de la traducción de dicho ARNm bacteriano o a una secuencia diana que contiene 20 bases por debajo (en dirección 3') del codón de inicio de la traducción de dicho ARNm bacteriano; y

(iii) una T<sub>m</sub>, cuando se encuentra hibridado a la secuencia diana, de entre 50°C y 65°C.

2.- El compuesto de la reivindicación 1, en el que las subunidades de morfolino del compuesto de oligonucleótido están unidas mediante enlaces de fosfordiamidato, según la estructura:



15 en donde Y<sub>1</sub>=O, Z=O, P<sub>j</sub> es un resto de emparejamiento de base de purina o pirimidina que es eficaz para unirse, mediante enlace de hidrógeno específico de base, a una base de un polinucleótido, y X es alquilo, alcoxi, tioalcoxi, amino o alquilamino, que incluye dialquilamino.

20 3.- El compuesto de la reivindicación 1 ó 2, en el que el compuesto de oligonucleótido tiene una secuencia dirigida que es complementaria a una secuencia diana que contiene el codón de inicio de la traducción del ARNm bacteriano.

4.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto de oligonucleótido tiene una secuencia dirigida que es complementaria a una secuencia diana de hasta 10 bases por debajo (en dirección 3') del codón de inicio de la traducción del ARNm bacteriano.

25 5.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto de oligonucleótido contiene sólo 11 bases, y su secuencia de ácido nucleico es completamente complementaria a la secuencia de ARNm diana.

30 6.- Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de oligonucleótido antisentido como el definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en la inhibición de una infección bacteriana en un sujeto mamífero.

7.- El compuesto de oligonucleótido antisentido para el uso de la reivindicación 6, en el que el sujeto debe tratarse adicionalmente mediante la administración de un compuesto no antisentido que tenga actividad antibacteriana.

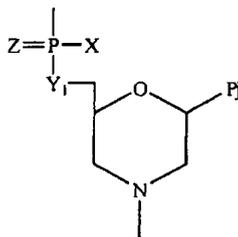
35 8.- Un compuesto para uso como medicamento, que comprende un compuesto de oligonucleótido de morfolino antisentido sustancialmente no cargado, que consiste en subunidades de morfolino y enlaces intersubunidades que contienen fósforo y que unen un nitrógeno de morfolino de una subunidad con un carbono exocíclico 5' de otra subunidad adyacente, y que tiene:

(i) no más de 12 bases de nucleótido,

40 (ii) una secuencia de ácido nucleico de no menos de 10 bases de longitud dirigida contra un ARNm bacteriano que codifica la proteína acpP, en donde dicha secuencia de ácido nucleico dirigida es complementaria a una secuencia diana que contiene el codón de inicio de la traducción de dicho ARNm bacteriano o a una secuencia diana que contiene 20 bases por debajo (en dirección 3') del codón de inicio de la traducción de dicho ARNm bacteriano; y

(iii) una  $T_m$ , cuando se encuentra hibridado a la secuencia diana, de entre 50°C y 65°C.

9.- El compuesto para el uso de la reivindicación 8, en el que las subunidades de morfolino del compuesto están unidas por enlaces de fosfordiamidato, según la estructura:



5 en donde  $Y_1=O$ ,  $Z=O$ ,  $P_j$  es un resto de emparejamiento de base de purina o pirimidina que es eficaz para unirse, mediante enlace de hidrógeno específico de base, a una base de un polinucleótido, y  $X$  es alquilo, alcoxi, tioalcoxi, amino o alquilamino, que incluye dialquilamino.

10 **10.-**El compuesto para uso de la reivindicación 8 ó 9, en el que la secuencia dirigida del compuesto es complementaria a al menos diez bases contiguas en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 2, 5, 8, 11 y 14.

**11.-**El compuesto para uso de la reivindicación 8 ó 9, que tiene una secuencia dirigida que es complementaria a una secuencia diana que contiene el codón de inicio de traducción del ARNm bacteriano.

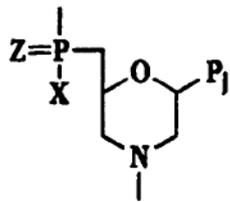
15 **12.-**El compuesto para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8, 9 u 11, que es complementario a una secuencia diana de hasta 10 bases por debajo (en la dirección 3') del codón de inicio de la traducción del ARNm bacteriano.

**13.-**El compuesto para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8, 9, 11 ó 12, en el que el compuesto contiene solo 11 bases, y su secuencia de ácido nucleico es completamente complementaria a la secuencia diana de ARNm.

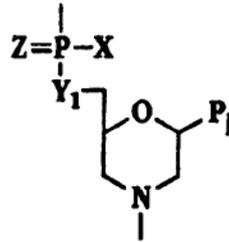
**14.-**El compuesto para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8, 9, 11 ó 12, en el que el compuesto contiene solo 10 bases, y su secuencia de ácido nucleico es completamente complementaria a la secuencia diana de ARNm.

20

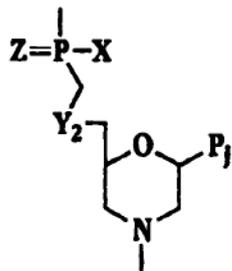
FIGURAS



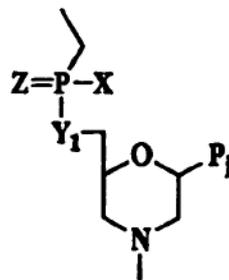
**Fig. 1A**



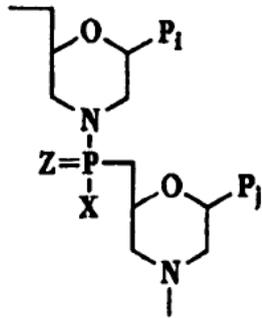
**Fig. 1B**



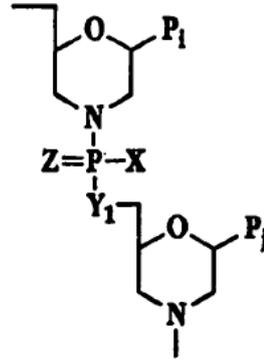
**Fig. 1C**



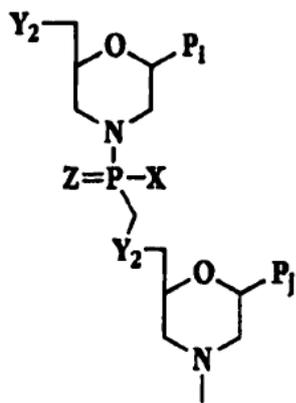
**Fig. 1D**



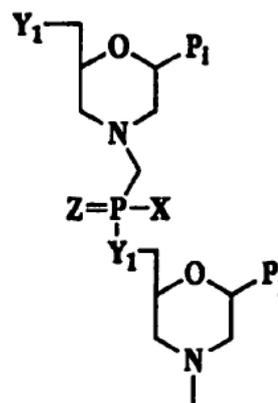
**Fig. 2A**



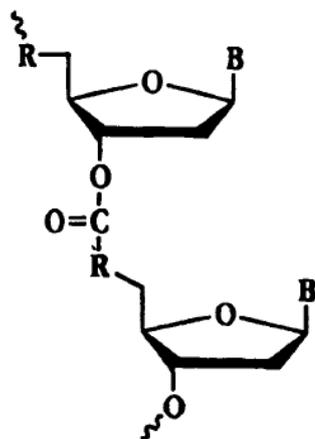
**Fig. 2B**



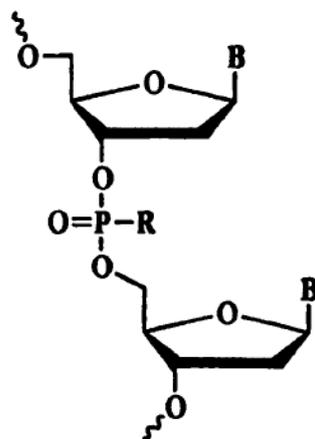
**Fig. 2C**



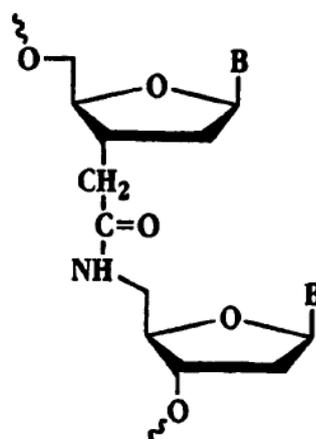
**Fig. 2D**



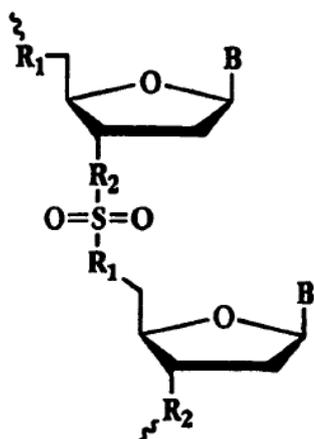
**Fig. 3A**



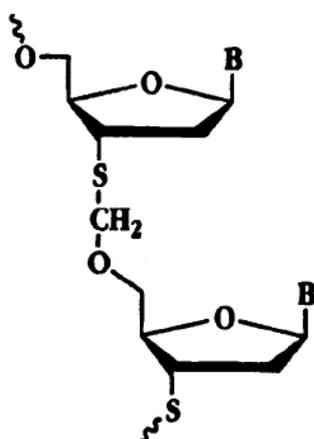
**Fig. 3B**



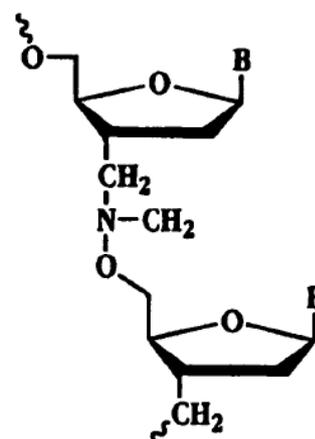
**Fig. 3C**



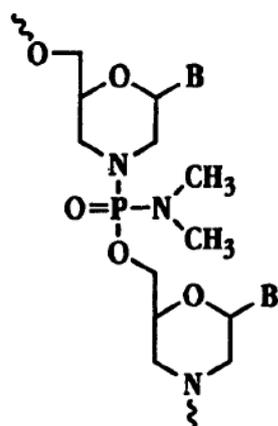
**Fig. 3D**



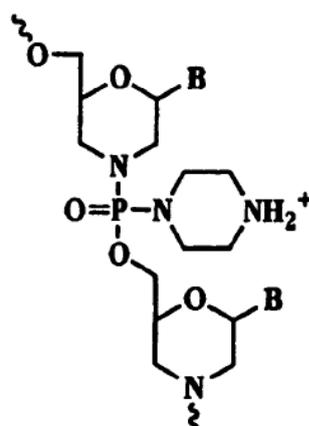
**Fig. 3E**



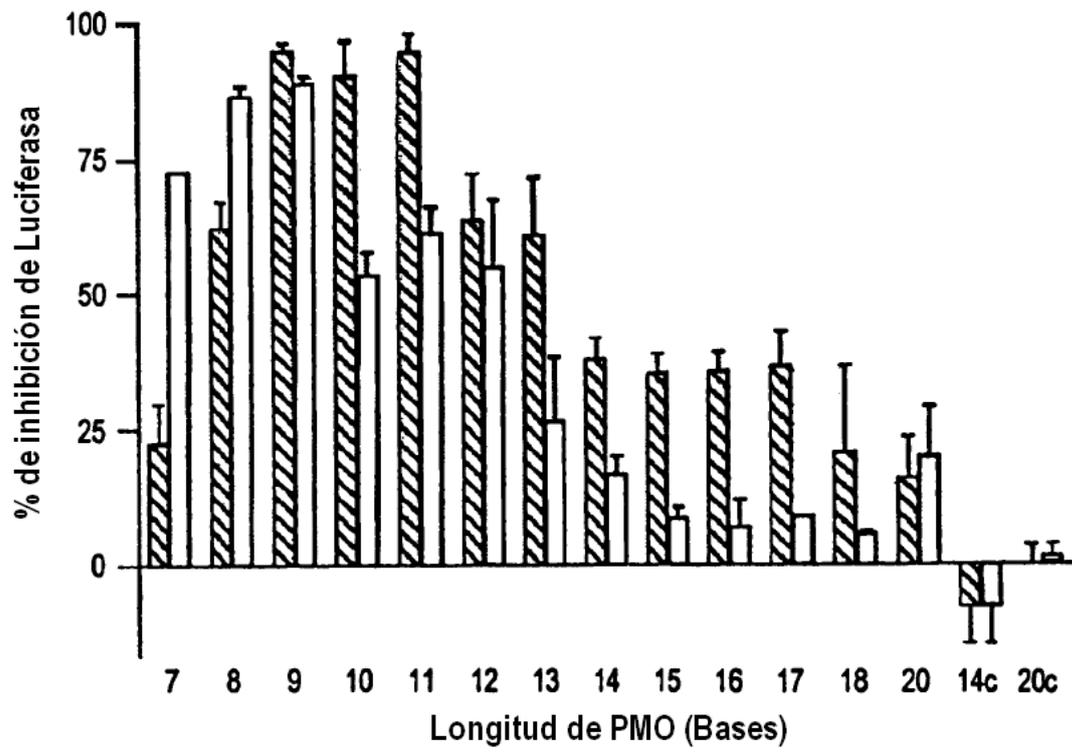
**Fig. 3F**



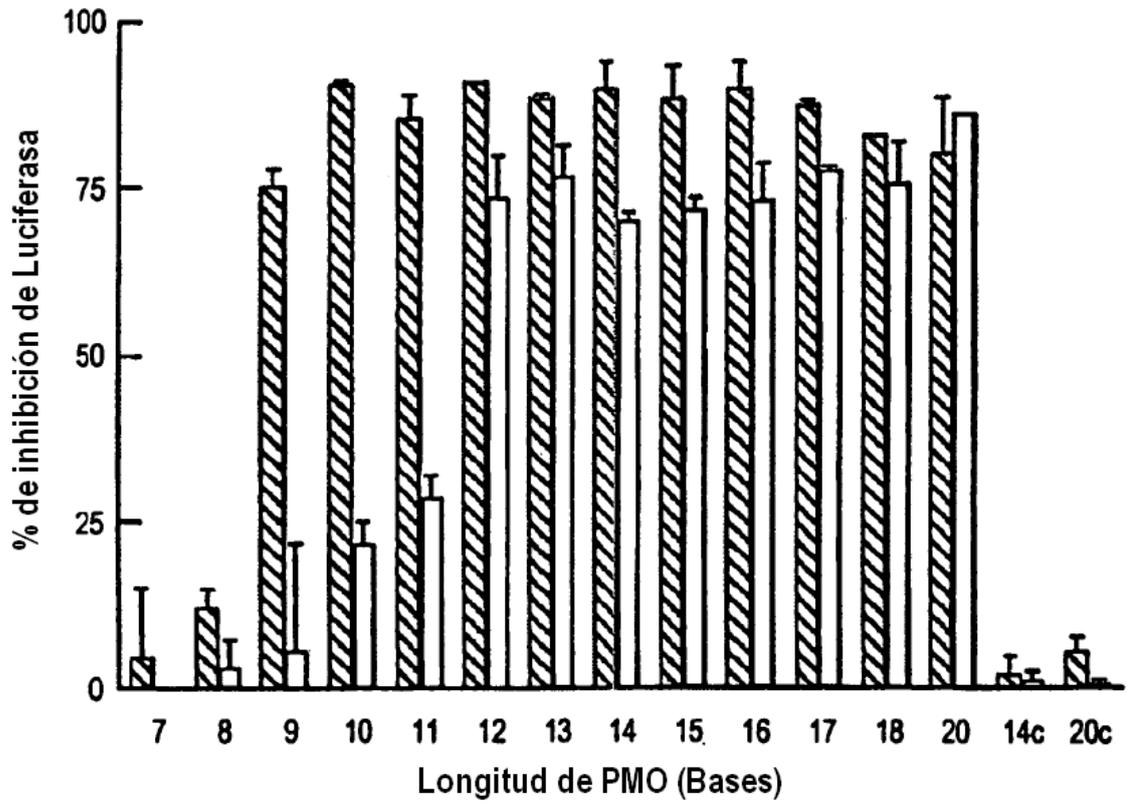
**Fig. 3G**



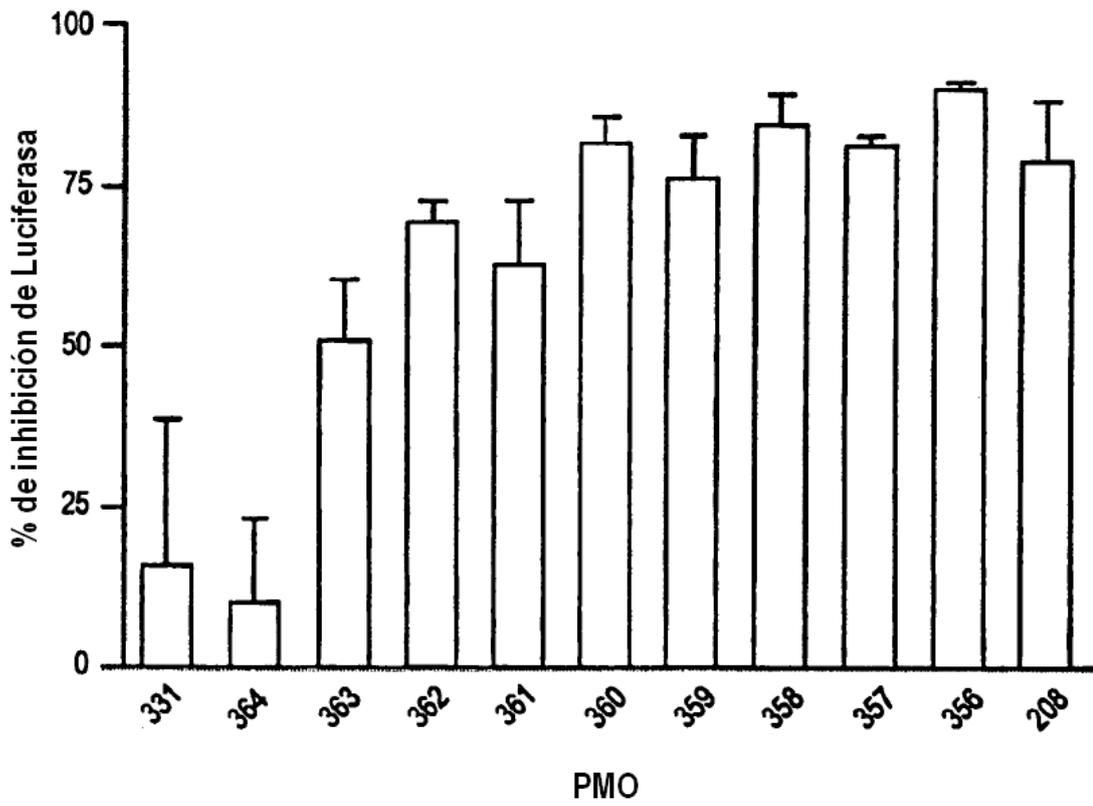
**Fig. 3H**



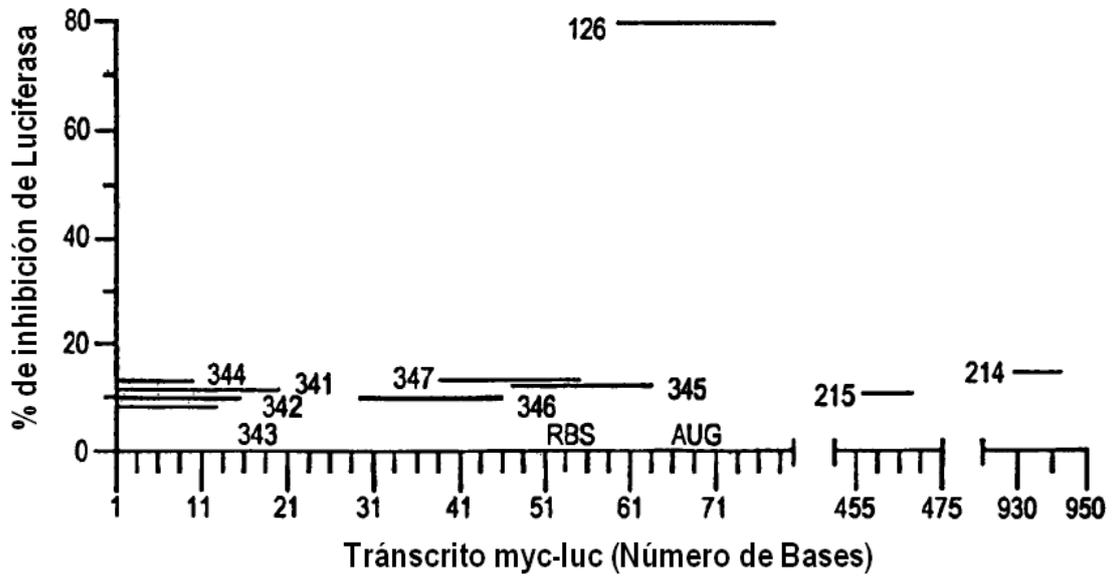
**Fig. 4**



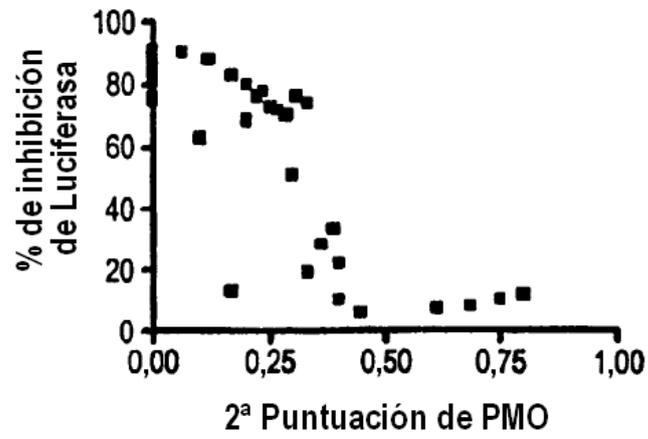
**Fig. 5**



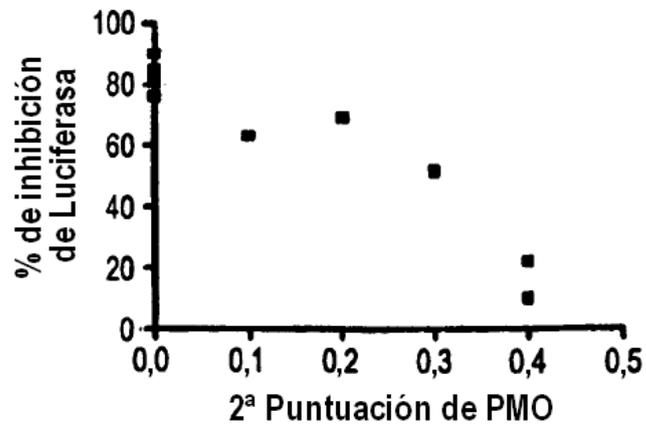
**Fig. 6**



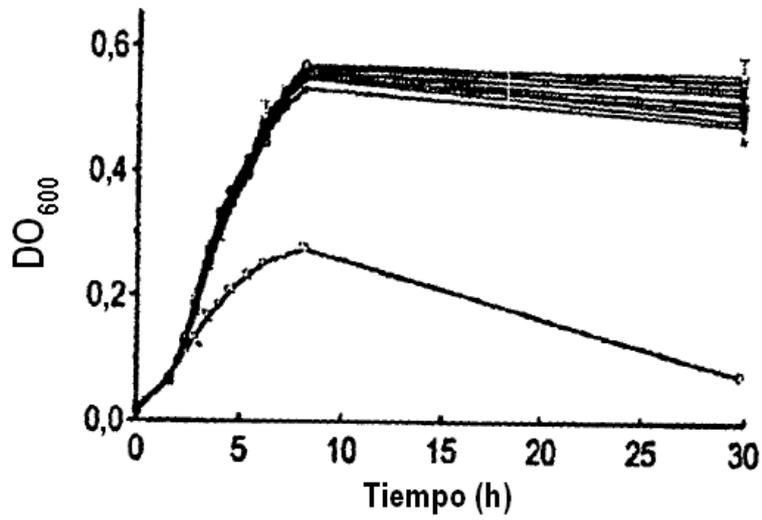
**Fig. 7**



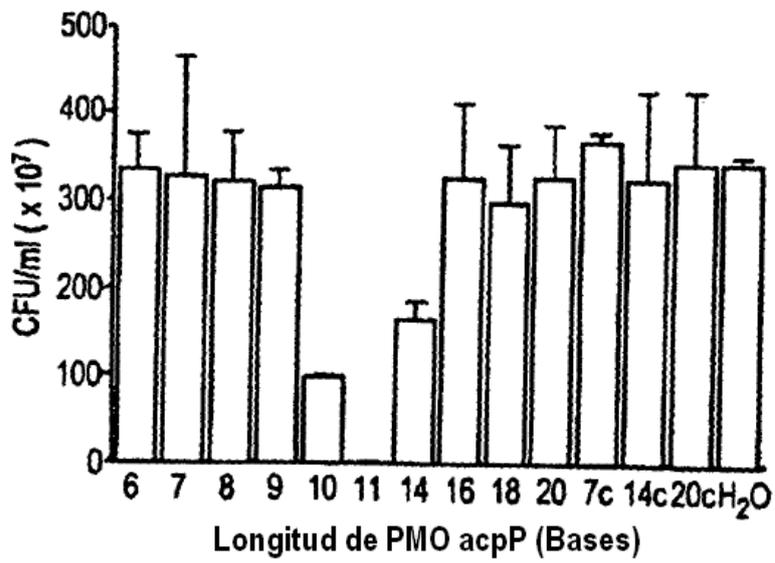
**Fig. 8A**



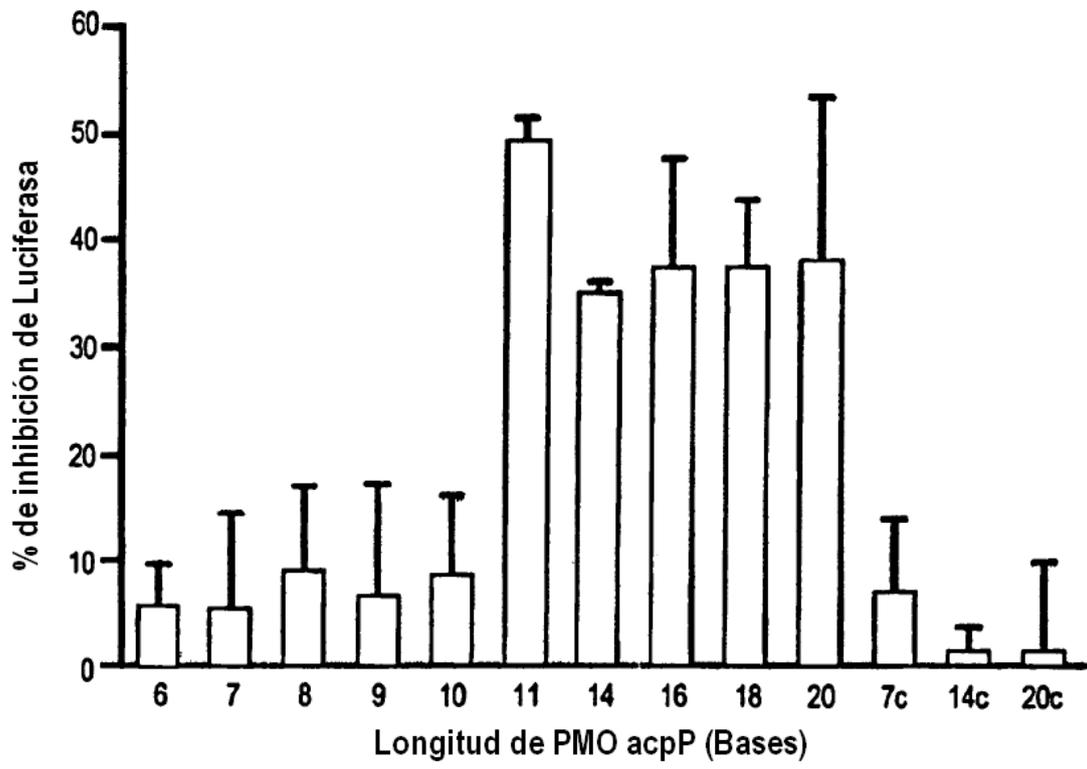
**Fig. 8B**



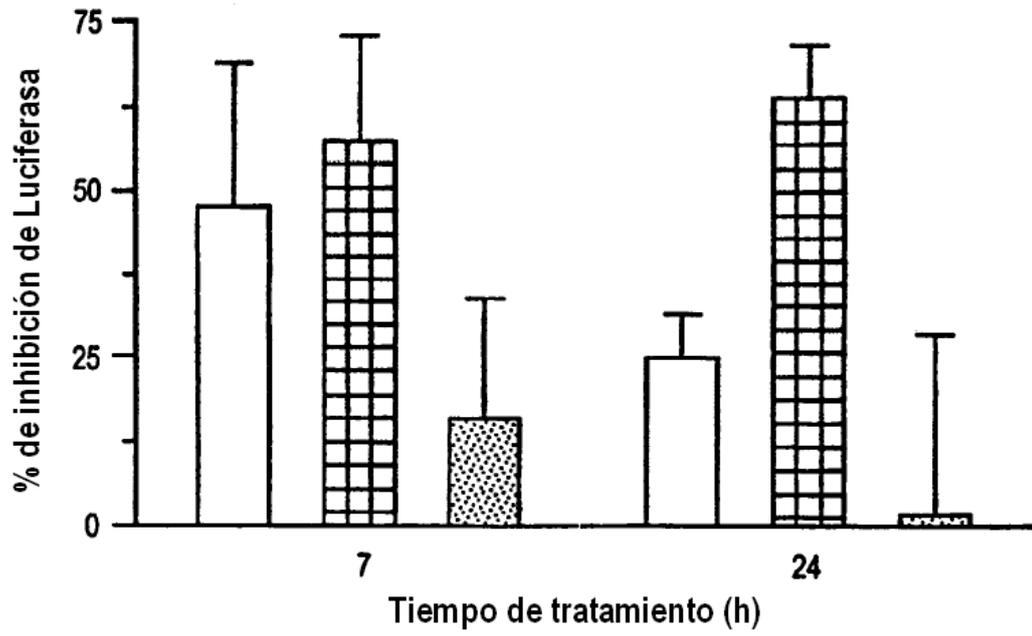
**Fig. 9A**



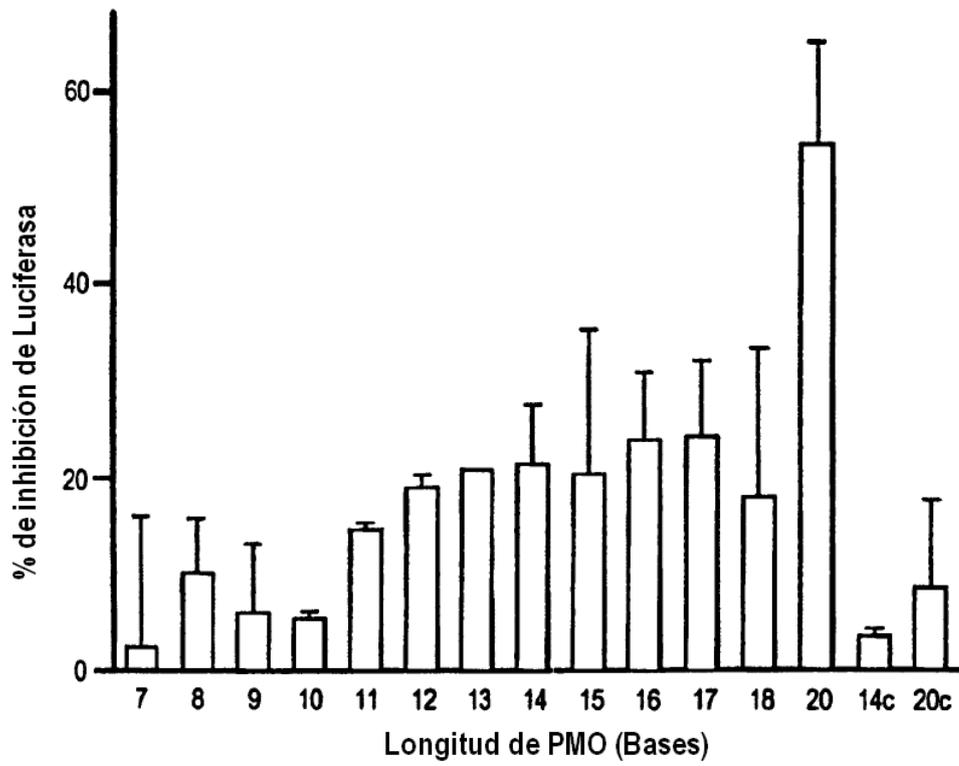
**Fig. 9B**



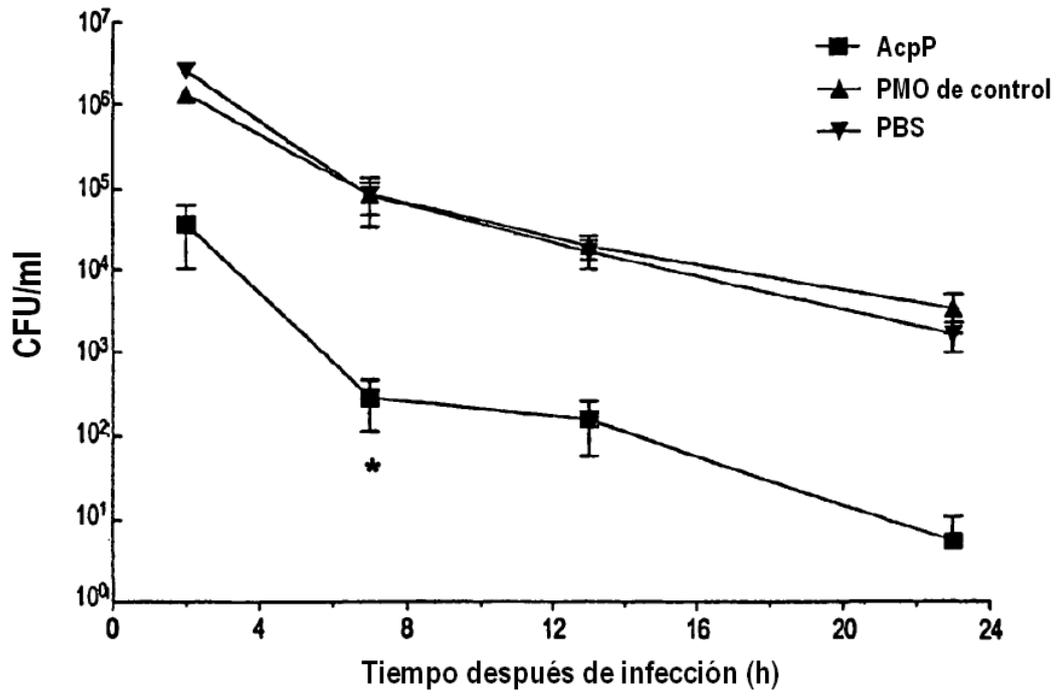
**Fig. 10**



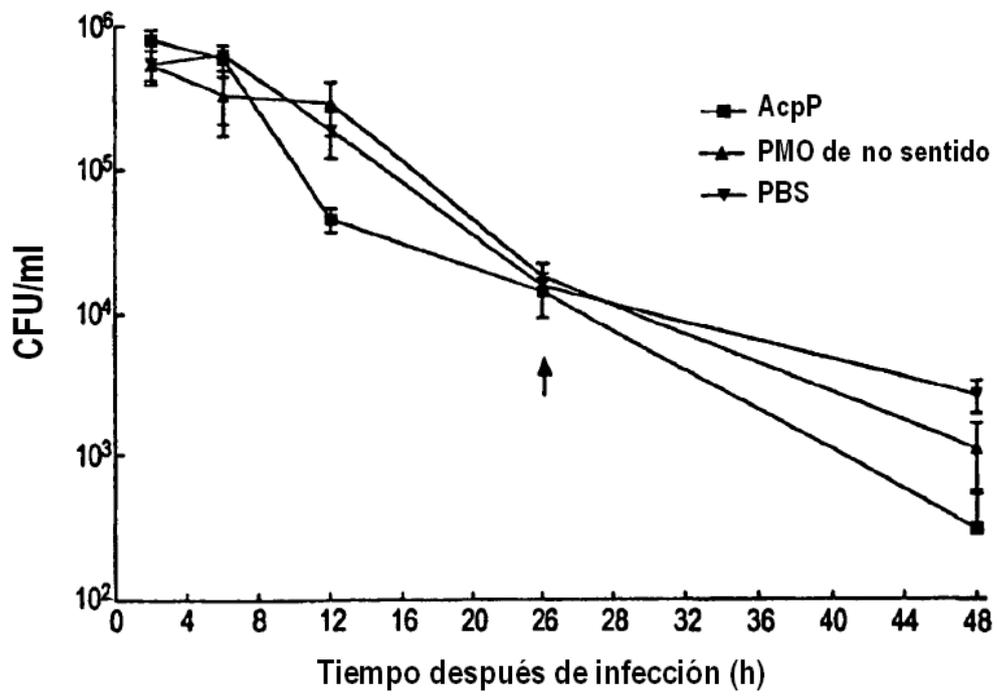
**Fig. 11**



**Fig. 12**



**Fig. 13**



**Fig. 14**