

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 444 640**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/66 (2006.01)
C40B 40/06 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2009 E 09785723 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 2334819**

(54) Título: **Señuelos de factores de transcripción**

(30) Prioridad:

03.10.2008 WO PCT/GB2008/003353
03.10.2008 US 102414 P
08.04.2009 GB 0906130
08.04.2009 US 167592 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2014

(73) Titular/es:

PROCARTA BIOSYSTEMS LIMITED (100.0%)
Norwich Bioincubator Norwich Research Park
Colney Lane
Norwich, Norfolk NR4 7UH, GB

(72) Inventor/es:

MCARTHUR, MICHAEL y
MOORE, JANE MARION

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 444 640 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

Señuelos de factores de transcripción

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para modular fenotipos de procariotas, particularmente bacterias patogénicas, usando secuencias señal de factores de transcripción.

5 El control del crecimiento y virulencia bacteriano plantea un problema creciente, particularmente en aplicaciones médicas y veterinarias, y puede convertirse en un reto importante para la salud pública. Los antibióticos para uso frente a bacterias patogénicas son muy conocidos en la técnica. Sin embargo, el uso extenso de dichos antibióticos ha dado lugar al surgimiento de bacterias que son resistentes al menos a uno, y en algunos casos, a múltiples antibióticos (las denominadas cepas resistentes a múltiples fármacos). La situación se exacerba por una disminución
 10 en el número de antibióticos convencionales que se descubren y que están en desarrollo. De hecho, la resistencia a antibióticos es un reto importante para la investigación antibacteriana y amenaza la potencia de los antibióticos comercializados así como los que todavía están en desarrollo. Consecuentemente, existe una necesidad para nuevos agentes anti-bacterianos que puedan usarse para abordar la diseminación e infección bacteriana.

15 Como un ejemplo, *Staphylococcus aureus* representa un reto importante para la salud global causando numerosas enfermedades humanas y animales, con un amplio espectro de gravedad desde infecciones en la piel hasta sepsis mortal por choque tóxico (Lowy, New Engl. J. Med. (1998) 339: 520-532). Se estima que el 20% de la población humana es portador de las bacterias en infección de tejido blando, frecuentemente con características clínicas no perceptibles, a partir de donde las bacterias pueden penetrar en el cuerpo para infectar la sangre y posteriormente los tejidos óseo y cardiaco (Gordon y Lowy, Clin. Infect. Dis. (2008) 40 (S5): S350-9). Aunque en un principio se pensó que era un patógeno extracelular, está surgiendo una evidencia sustancial que sugiere que *S. aureus* puede evitar la acción antibacteriana o el engullimiento por macrófagos persistiendo intercelularmente (Garzoni y Kelley, Trends Microbiol. (2009) 17: 59-65), complicando potencialmente su tratamiento. Los mecanismos de resistencia también se han adquirido o se han desarrollado desde la primera exposición a antibióticos hasta tal grado que las cepas resistentes a múltiples fármacos son ahora la norma en la clínica (Hawkey, J. Antimicrob. Chemother. (2008) 62 (S1): ii-9), lo que ha limitado adicionalmente las opciones de tratamiento.
 20
 25

Existen varias razones por las que *S. aureus* es un patógeno tan versátil: posee mecanismos para evadirse de la respuesta inmune del huésped (Foster, Nat. Rev. Microbiol. (2005) 3: 948-958); puede producir una amplio rango de determinantes de virulencia (Novick, Mol. Micro. (2003) 48: 1429-1449); tiene la capacidad de catabolizar los tejidos del huésped (Vojtov et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 10102-10107) y puede adaptarse fácilmente a entornos con nutrientes limitados y anóxicos encontrados en el interior del huésped (Haselbeck et al, Curr. Pharm. Des. (2002) 8: 1155-1172). Muchos de estos procesos están controlados a nivel de la transcripción y como tales actualmente no son las dianas de los antibióticos tradicionales (que actúan mayoritariamente en la síntesis de la pared celular, proteínas o ADN).

30 Las infecciones por *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* Grupo A: GAS) pueden tratarse habitualmente con muchos antibióticos diferentes. El tratamiento temprano puede reducir el riesgo de muerte por la enfermedad invasiva streptococcal del grupo A. Sin embargo, incluso el mejor cuidado médico no previene la muerte en cada caso. Para aquellos con una enfermedad muy grave, puede necesitarse el cuidado paliativo en una unidad de cuidado intensivo. Para las personas con fascitis necrosante, frecuentemente es necesaria la cirugía para eliminar el tejido dañado. Han surgido cepas de *S. pyogenes* resistentes a antibióticos macrólidos, sin embargo todas las cepas permanecen uniformemente sensibles a penicilina.
 35
 40

45 La resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a penicilina y otras beta-lactamas se está incrementando en todo el mundo. El mecanismo principal de resistencia implica la introducción de mutaciones en genes que codifican proteínas de unión a penicilina. Se piensa que la presión selectiva juega un papel importante y el uso de antibióticos beta-lactama se ha implicado como un factor de riesgo para infección y colonización. *Streptococcus pneumoniae* es responsable de neumonía, bacteremia, otitis media, meningitis, sinusitis, peritonitis y artritis.

50 La neumonía resistente a penicilina causada por *Streptococcus pneumoniae* (conocida comúnmente como *pneumococcus*), se detectó por primera vez en 1967, como lo fue la gonorrea resistente a penicilina. La resistencia a sustitutos de penicilina también se conoce más allá de *S. aureus*. Hacia 1993 *Escherichia coli* era resistente a cinco variantes de fluoroquinolona. *Mycobacterium tuberculosis* es resistente comúnmente a isoniazida y rifampina y algunas veces resistente universalmente a los tratamientos comunes. Otros patógenos que muestran alguna resistencia incluyen *Salmonella*, *Campylobacter* y *Streptococci*.

Enterococcus faecium es otro microorganismo multirresistente encontrado en hospitales. Los Enterococcus resistentes a penicilina se observaron en 1983, enterococcus resistentes a vancomicina (VRE) en 1987 y Enterococcus resistentes a linezolid (LRE) al final de la década de 1990.

55 *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista altamente prevalente. Una de las características más preocupantes de *P. aeruginosa* consiste en su baja susceptibilidad a antibióticos. Esta baja susceptibilidad es atribuible a una acción concertada de bombas de eflujo multifármaco con genes de resistencia a antibióticos

- codificados cromosómicamente (por ejemplo, *mexAB-oprM*, *mexXY* etc) y la baja permeabilidad de las cubiertas celulares bacterianas. Además de la resistencia intrínseca, *P. aeruginosa* desarrolla fácilmente resistencia adquirida bien por mutación en genes codificados cromosómicamente o por transferencia génica horizontal de determinantes de resistencia a antibióticos. El desarrollo de resistencia a múltiples fármacos por aislados pde *P. aeruginosa*
- 5 requiere varios eventos genéticos diferentes que incluyen la adquisición de diferentes mutaciones y/o la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos. La hipermutación favorece la selección de resistencia a antibióticos dirigida por mutación en cepas de *P. aeruginosa* que producen infecciones crónicas, mientras que el agrupamiento de varios genes de resistencia a antibióticos diferentes en integrones favorece la adquisición concertada de determinantes de resistencia a antibióticos. Algunos estudios recientes han mostrado que la resistencia fenotípica asociada con la formación de biopelícula o con el surgimiento de variantes de colonia pequeña puede ser importante en la respuesta de poblaciones de *P. aeruginosa* al tratamiento con antibióticos (Cornelis P. (editor) *Pseudomonas: Genomics and Molecular-Biology* (1^a ed.) (2008) Caister Academic Press).
- 10 *Clostridium difficile* es un patógeno nosocomial que causa enfermedad diarreica en hospitales de todo el mundo. Se indicó que *C. difficile* resistente a clindamicina era el agente causante de grandes brotes de enfermedad diarreica en hospitales en Nueva York, Arizona, Florida y Massachusetts entre 1989 y 1992 (Johnson S. et al, New England Journal of Medicine (1999) 341: 1645-1651). Los brotes dispersos geográficamente de cepas de *C. difficile* resistentes a antibióticos fluoroquinolona, tales como ciprofloxacina y levofloxacina, también se indicaron en América del Norte en 2005 (Loo V. et al N. Engl. J. Med. (2005) 353 (23): 2442-9).
- 15 *E. coli* y *Salmonella* provienen directamente de comida contaminada. De la carne que está contaminada con *E. coli*, el ochenta por ciento de las bacterias son resistentes a uno o más fármacos preparados; causa infecciones de vejiga que son resistentes a antibióticos ("HSUS Fact Sheet"). *Salmonella* se encontró por primera vez en los seres humanos en los años 70 y en algunos casos es resistente a tantos como nueve antibióticos diferentes ("HSUS Fact Sheet"). Cuando ambas bacterias se diseminan, surgen afecciones serias para la salud. Mucha gente se hospitaliza cada año después de haber sido infectada y como resultado algunos mueren.
- 20 25 El 5 de noviembre de 2004, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) indicaron un número creciente de infecciones sanguíneas por *Acinetobacter baumannii* en pacientes en instalaciones médicas militares en las que se trataron integrantes de las Fuerzas Armadas lesionados en la región Iraq/Kuwait y en Afganistán. La mayor parte de éstos mostraron resistencia a múltiples fármacos con unos pocos aislados resistentes a todos los fármacos ensayados.
- 30 35 Norris et al (Gene Therapy (2000), 7: 723-725) revisan estrategias de terapia génica usando bacteriófagos para combatir bacterias que son resistentes a múltiples antibióticos, mientras Cranenburgh et al (Nucl. Acid Res. (2001) 29(5): e26) describen la creación de dos cepas de *E. coli* que permiten el uso de titulación de represor, en lugar de selección con antibiótico, para la selección y propagación de plásmidos.
- 40 45 Las terapias basadas en ADN constituyen una nueva clase de agentes anti-bacterianos que se diseñan para funcionar en dianas génicas que son esenciales para la viabilidad o patogenicidad. Dichas terapias son potencialmente aplicables a una amplia diversidad de patógenos y se anticipa que el desarrollo de resistencia a estos terapéuticos, a través de la modificación del sitio diana, es un evento altamente improbable. Además, los agentes tienen las ventajas de tiempos de desarrollo potencialmente más rápidos y actúan simultáneamente en un número de dianas nuevas sin resistencia.
- 50 Los Señuelos de Factores de Transcripción (TFD) son uno de dichos terapéuticos basados en ADN. Los oligonucleótidos señuelo se diseñan para mimetizar los sitios de unión de factores de transcripción y prevenir que estos últimos se unan a sus dianas genómicas afines, con una modificación consecuente de la expresión génica (Mann y Dzau, J. Clin. Investigation (2000) 106: 1071-1075).
- 55 Su utilidad se ha demostrado principalmente en sistemas eucariotas, en los que un estímulo para su desarrollo fue su potencial para funcionar como nuevas clases de agentes terapéuticos (Mann y Dzau (2000)). Para este fin, los oligonucleótidos señuelo se han usado para demostrar que el factor de transcripción EF2 reprime la proliferación del músculo liso en ratas (Morishita et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 95: 5855-5859); para bloquear la proliferación mediada por STAT3 de carcinomas (Leong et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2003) 100: 4138-4143); y para mostrar que tomar como diana el elemento de respuesta AMPc puede controlar la proliferación del cáncer *in vivo* (Park et al, J. Biol. Chem. (1999) 274: 1573-1580).

Los TFD tienen ventajas únicas sobre otros terapéuticos basados en ADN. Su mecanismo de acción es sencillo-controlan la expresión génica secuestrando factores de transcripción, previniendo que estos últimos se unan a

promotores inundando la célula con numerosas copias de las secuencias de unión específicas (por esto, el término "señuelos"). Esto contrasta con las estrategias antisentido en las que las dianas son difíciles de definir debido a la estructura secundaria compleja del ARNm. En comparación con las estrategias antisentido, los TFD tienen las ventajas adicionales de que actúan rápidamente, previniendo la expresión de genes, mientras que las estrategias antisentido

5 está dirigida a las consecuencias de la expresión. Como resultado, los TFD son eficaces a concentraciones mucho más bajas, porque una única interacción TFD-factor de transcripción puede bloquear la transcripción de un único gen que de otra manera puede dar lugar a muchos miles de copias de ARNm, que constituyen las dianas para la estrategia antisentido.

10 Por lo que saben los inventores, se han hecho dos publicaciones del uso de señuelos en procariotas. En la primera, se usó un oligonucleótido señuelo rico en AT, diseñado para mimetizar un elemento rico en AT en el promotor de los genes de ribulosa 1,5,-bifosfato carboxilasa/oxygenasa (*rbc*), para alterar la regulación por CO₂ de la expresión de los genes *rbc* en *Cyanobacterium* (Onizuka et al, FEBS Lett. (2003) 542: 42-46).

15 En la segunda publicación, se usaron oligonucleótidos señuelo para identificar nuevas secuencias reguladoras en cis en el promotor de *actII-orf4* en *S. coelicolor A3(2)*, que codifica el activador específico de la ruta para la producción del antibiótico actinorhodina (McArthur y Bibb, PNAS (2008) 105: 1020-1025).

La presente invención se ha concebido ante estos antecedentes.

20 Los inventores han usado la tecnología TFD para alterar la regulación de rutas celulares, respuestas y mecanismos de resistencia en procariotas con el fin de alterar la viabilidad celular. Por ejemplo, los métodos pueden usarse para alterar uno o más de los fenotipos de resistencia a antibióticos, respuestas celulares adaptativas a condiciones medioambientales, virulencia celular y metabolismo celular esencial. Haciendo esto, los inventores han proporcionado medios para tratar infecciones bacterianas y contener el crecimiento bacteriano.

De acuerdo con esto, en un aspecto la invención reside en el uso de factores señuelo de la transcripción (TFD) para reducir la viabilidad de células procariotas.

25 En particular, la invención engloba un método para reducir la viabilidad de células procariotas, comprendiendo el método:

(a) proporcionar un polinucleótido señuelo que comprende un sitio de unión para un factor de transcripción diana (una secuencia señuelo);

(b) introducir el polinucleótido señuelo en una célula procariota que comprende un sitio de unión para el factor de transcripción, unido operativamente a un gen o genes;

30 en el que la introducción del polinucleótido señuelo reduce la unión del factor de transcripción diana al sitio de unión en la célula y causa una alteración en la expresión del gen o genes unidos operativamente;

y en el que el factor de transcripción diana comprende un regulador de la expresión de un gen o genes que codifican uno o más de:

(i) una respuesta celular adaptativa;

35 (ii) un mecanismo celular intrínseco de resistencia a antibióticos;

(iii) un factor celular de virulencia;

(iv) una respuesta celular al estrés; o

(v) un gen celular esencial.

En otro aspecto, la invención proporciona:

40 - un método para incrementar la susceptibilidad procariota a antibióticos, comprendiendo el método:

(a) proporcionar un polinucleótido señuelo que comprende un sitio de unión para un factor de transcripción diana (una secuencia señuelo);

(b) introducir el polinucleótido señuelo en una célula procariota que comprende un sitio de unión para el factor de transcripción, unido operativamente a un gen o genes;

45 en el que la introducción del polinucleótido señuelo reduce la unión del factor de transcripción diana al sitio de unión en la célula y causa una alteración en la expresión del gen o genes unidos operativamente, incrementando de esta manera la susceptibilidad a antibióticos de la célula;

y en el que el factor de transcripción diana comprende un regulador de la expresión de un gen o genes que codifican uno o más de:

- (i) una respuesta celular adaptativa;
- (ii) un mecanismo celular intrínseco de resistencia a antibióticos;
- 5 (iii) un factor celular de virulencia;
- (iv) un gen celular esencial.

También se describe:

- un polinucleótido señuelo que comprende un sitio de unión para un factor de transcripción diana, en el que el sitio de unión no está unido operativamente a un gen, y en el que el factor de transcripción comprende un regulador de la expresión de un gen o genes que codifican uno o más de:

- (i) una respuesta celular adaptativa;
- (ii) un mecanismo celular intrínseco de resistencia a antibióticos;
- (iii) un factor celular de virulencia;
- (iv) un gen celular esencial.

15 El factor de transcripción diana puede seleccionarse de: WhiB7 (SEQ ID NOs: 5 y 9); FabB (SEQ ID NO: 6); LytM (SEQ ID NO: 7); Ssa (SEQ ID NO: 8); FadR (SEQ ID NO: 10); YycG/YycF (SEQ ID NOs: 11 y 12); Sigma 54 (o SigA) (SEQ ID NOs: 13 y 14); Fur (SEQ ID NOs: 15, 16 y 17); TcdR (SEQ ID NO: 18); Vfr (SEQ ID NOs: 19, 20 y 21); NtrC (SEQ ID NO: 22); ArsR (SEQ ID NOs: 23 y 24); TcaA (SEQ ID NO: 25); AgrA (SEQ ID NOs: 26 y 27); WalR (SEQ ID NOs: 44, 45, 48, 49 y 57); sigB (SEQ ID NO: 58); o Ksig (SEQ ID NOs: 59 y 60); o una variante u homólogo funcional de cualquiera de éstos.

También se describe un polinucleótido señuelo como se ha descrito anteriormente que comprende más de un sitio de unión para más de un factor de transcripción diana.

25 - una célula que comprende un polinucleótido señuelo exógeno, comprendiendo el polinucleótido un sitio de unión para un factor de transcripción diana que no está unido operativamente a un gen; en el que la célula comprende un sitio de unión para el factor de transcripción unido operativamente a un gen o genes; y en el que el factor de transcripción diana comprende un regulador de la expresión de un gen o genes que codifican uno o más de:

- (i) una respuesta celular adaptativa;
- (ii) un mecanismo celular intrínseco de resistencia a antibióticos;
- (iii) un factor celular de virulencia;
- 30 (iv) un gen celular esencial.

- un método para tratar una infección bacteriana en un sujeto que comprende administrar un polinucleótido señuelo de la invención, opcionalmente en combinación con uno o más antibióticos y/o agentes antibacterianos.

35 - un método *ex vivo* para matar bacterias, inhibir el crecimiento bacteriano o reducir la virulencia bacteriana, comprendiendo el método aplicar un polinucleótido señuelo de la invención, opcionalmente en combinación con uno o más antibióticos y/o agentes antibacterianos.

- una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido señuelo de la invención y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en combinación con uno o más antibióticos y/o agentes antibacterianos.

40 - una composición desinfectante que comprende un polinucleótido señuelo de la invención, opcionalmente en combinación con uno o más antibióticos y/o agentes antibacterianos.

- una composición de lavado que comprende un polinucleótido señuelo de la invención, opcionalmente en combinación con uno o más antibióticos y/o agentes antibacterianos.

45 - un kit que comprende un polinucleótido señuelo de la invención, y uno o más antibióticos y/o agentes antibacterianos, en el que el señuelo y el uno o más antibióticos y/o agentes antibacterianos son para uso combinado para matar bacterias, inhibir el crecimiento bacteriano o reducir la virulencia bacteriana.

- un método para reducir la virulencia de una célula procariota, comprendiendo el método:

- (a) proporcionar un polinucleótido señuelo que comprende un sitio de unión para un factor de transcripción diana;
- (b) introducir el polinucleótido señuelo en una célula procariota que comprende un sitio de unión para el factor de transcripción, unido operativamente a un gen o genes;
- 5 en el que la introducción del polinucleótido señuelo reduce la unión del factor de transcripción diana al sitio de unión en la célula y causa una alteración en la expresión del gen o genes unidos operativamente, reduciendo de esta manera la virulencia;
- y en el que el factor de transcripción diana comprende un regulador de la expresión de un gen o genes que codifican uno o más de:
- 10 (i) una respuesta celular adaptativa;
- (ii) un mecanismo celular intrínseco de resistencia a antibióticos;
- (iii) un factor celular de virulencia;
- (iv) un gen celular esencial.
- un polinucleótido señuelo que comprende un sitio de unión para un factor de transcripción diana, en el que el sitio de unión tiene una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 60.
- 15 - uso de un polinucleótido señuelo que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 60 en el tratamiento de una infección bacteriana.
- En general, una secuencia de señuelo de factor de transcripción (TFD) (o secuencia señuelo) comprende un sitio de unión de factor de transcripción que comprende o compite con una secuencia reguladora en *cis* nativa o endógena en una célula para la unión a un factor de transcripción afín en la célula. Cuando se introduce en células huésped adecuadas que comprenden la secuencia reguladora en *cis* (por un método descrito en la presente memoria o de otra manera) la secuencia señuelo compite con la secuencia reguladora en *cis* en una célula para la unión al factor de transcripción afín. Dicha competición reduce la unión del factor de transcripción a la secuencia reguladora en *cis* en la célula y altera la expresión de un gen o genes cuya expresión está regulada por la unión del factor de transcripción a la secuencia reguladora en *cis*. La función señuelo como se usa en la presente memoria se refiere a la capacidad de una secuencia para competir con una secuencia reguladora en *cis* para la unión a un factor de transcripción afín de esta manera.
- Una secuencia o elemento regulador en *cis* se refiere generalmente a una secuencia de nucleótidos que ocurre en 5' (5') o en 3' (3') del sitio de comienzo de la transcripción de un gen o genes y que funciona para regular la expresión del gen o genes. Típicamente, una secuencia reguladora en *cis* comprende un sitio de unión para una proteína (factor de transcripción) y la unión de la proteína regula la transcripción del gen o genes dados. La unión de la proteína a la secuencia resulta directamente o indirectamente en la modulación de la expresión del gen o genes. Por ejemplo, la proteína unida puede interaccionar con otra proteína unida a una región cercana que se necesita para la transcripción y el anclaje de la proteína en la posición correcta, o puede inhibir la unión de otra proteína que es necesaria para la transcripción. Típicamente, la secuencia o elemento regulador en *cis* ocurre en la región promotora de un gen, pero no es raro en procariotas que las secuencias reguladoras en *cis* estén situadas cientos de pares de bases en 5' o en 3' de los genes en los que influyen.
- Una secuencia reguladora en *cis* puede ser represora (inhibe o reduce la transcripción del gen o genes cuando está unida por un factor de transcripción) o activadora (activa o incrementa la transcripción del gen o genes cuando está unida por un factor de transcripción). Así, un factor de transcripción que se une a una secuencia reguladora en *cis* puede ser un efecto negativo (proteína represora) o un efecto positivo (activador).
- Una secuencia diana para un polinucleótido señuelo o secuencia señuelo se refiere al sitio de unión celular del factor de transcripción con el que compite para la unión del factor de transcripción. De manera similar, el regulador diana es el factor de transcripción al que se une la secuencia señuelo. El gen o genes diana de la secuencia señuelo es el gen o genes que están/unidos operativamente al sitio de unión celular del factor de transcripción. Así, una secuencia señuelo altera la regulación de la expresión del gen o genes diana.
- Los inventores han usado señuelos para alterar fenotipos procariotas, especialmente fenotipos que son relevantes para la patogenicidad bacteriana y para abordar la infección bacteriana. En particular, los inventores han usado señuelos para alterar la expresión de rutas celulares, respuestas y mecanismos de resistencia con el fin de hacer que las células sean más susceptibles a la muerte o inhibición del crecimiento, y/o menos capaces de sobrevivir en condiciones hostiles, y/o menos virulentas.
- 50 En un aspecto, los presentes métodos alteran la expresión génica con el fin de hacer que las células sean menos viables, por ejemplo, en las condiciones predominantes. Por ejemplo, las células pueden volverse menos viables debido a una susceptibilidad incrementada a antibióticos, respuesta deficiente al estrés, respuesta de virulencia

deficiente y/o expresión alterada de genes esenciales. Los presentes métodos pueden usar señuelos para debilitar los sistemas celulares de defensa o supervivencia y/o los sistemas de virulencia. Los métodos pueden hacer que las células sean más vulnerables a la muerte celular y/o inhibir el crecimiento o patogenicidad. Así, en un aspecto, los presentes señuelos pueden producir un efecto bactericida o bacteriostático.

5 Por ejemplo, en un aspecto, los inventores han usado señuelos para alterar el fenotipo de susceptibilidad a antibióticos de procariotas, en particular bacterias y especialmente bacterias patogénicas. En un aspecto, el incremento en la susceptibilidad no es específico para un antibiótico o clase de antibiótico. En un aspecto, el incremento en la susceptibilidad no es específico para la estructura y/o mecanismo de un antibiótico cualquiera o clase de antibiótico. En un aspecto, se incrementa la sensibilidad para un amplio espectro de antibióticos o clases de antibióticos.

10 En un aspecto, un incremento en la susceptibilidad no es específico para un antibiótico cualquiera o clase de antibiótico seleccionado de: aminoglicósidos (tal como kanamicina); de los carbapenemos (tal como meropenem); las cefalosporinas (tal como cefepima); los glicopéptidos (tal como vancomicina y daptomicina); las penicilinas (tal como ampicilina, carbenicilina y penicilina); los antibióticos polipeptídicos (tal como polimixcina B); las quinolinas (tal como levaquina); las sulfonamidas (tal como Bactrim); las tetraciclinas (tal como tetraciclina); y de forma diversa, cloranfenicol, rifampicina, Zyvox.

15 Los métodos señuelo descritos en la presente memoria también pueden usarse para alterar fenotipos tales como respuestas celulares adaptativas o virulencia celular. Los métodos también pueden usarse para alterar la expresión celular de genes esenciales y supervivencia celular, por ejemplo, en condiciones dadas de cultivo o fisiológicas, por ejemplo, nutrientes limitantes.

20 En general, los métodos proporcionan nuevos medios para tomar como diana infecciones bacterianas y enfermedades asociadas. Esto puede ser por la potenciación de los efectos de un antibiótico o por un efecto inhibidor directo en las bacterias, por ejemplo, inhibición del crecimiento o supervivencia, inhibición de la expresión de determinantes de virulencia, inhibición de la expresión de genes esenciales. Así, un TFD puede actuar como un antibiótico o un agente antibacteriano en sí mismo. En un aspecto, los métodos usan señuelos que alteran la expresión de genes que determinan la viabilidad celular.

Como anteriormente, los presentes métodos usan señuelos para alterar la regulación de rutas celulares, respuestas y mecanismos de resistencia. En algunos casos, esto implica tomar como diana la unión de una molécula reguladora global. El o los genes diana pueden ser aquellos que están regulados en respuesta a antibiótico.

25 30 Las dianas pueden incluir reguladores de mecanismos intrínsecos de resistencia a antibióticos, incluyendo mecanismos intrínsecos de resistencia a múltiples fármacos. Los mecanismos intrínsecos pueden proporcionar una barrera física a los fármacos tales como antibióticos, por ejemplo incrementando la velocidad a la que los antibióticos se eliminan de la célula o reduciendo la penetrabilidad o permeabilidad de la pared celular. Los mecanismos intrínsecos pueden proporcionar resistencia a antibióticos que han entrado en el citoplasma. Los mecanismos intrínsecos de resistencia pueden inducirse en respuesta a condiciones medioambientales, tales como estrés u otras condiciones listadas en la presente memoria. En algunos casos, la expresión de genes que codifican mecanismos intrínsecos de resistencia está regulada en respuesta a antibióticos. Por ejemplo, éstos pueden ser genes que codifican proteínas con un papel fisiológico cuya expresión está regulada de manera diferente en respuesta a antibióticos. Los genes que codifican proteínas con un papel en la resistencia intrínseca pueden codificar por ejemplo, bombas de eflujo o proteínas que determinan la composición de la pared celular o densidad o metabolismo de la pared celular. En un aspecto, los genes diana codifican un mecanismo de resistencia que no es específico de antibiótico o no específico de clase de antibióticos, por ejemplo, en términos de estructura o mecanismo del antibiótico.

35 40 45 Las dianas pueden incluir reguladores de las respuestas celulares adaptativas. Típicamente, éstas son respuestas adaptativas a condiciones medioambientales, por ejemplo, condiciones medioambientales hostiles. Por ejemplo, éstas incluyen respuestas al estrés tales como respuestas al estrés oxidativo o respuestas al estrés de peróxido, respuestas a carencia de nutrientes, por ejemplo, limitación de nitrógeno, respuestas a toxinas, por ejemplo, matalotoxinas tales como condiciones de alto hierro, respuestas a condiciones de alta acidez (pH bajo). Así, las dianas pueden incluir reguladores de genes de respuesta al estrés, proteínas metaloreguladoras, y reguladores de los genes de fijación del nitrógeno.

50 55 Los genes celulares adaptativos son aquellos cuya expresión está determinada por factores medioambientales e influyen en la capacidad de la bacteria para sobrevivir y causar enfermedad en ese medioambiente. Por ejemplo, una bacteria puede necesitar adaptarse a condiciones de baja concentración de hierro encontradas en el interior de un huésped y hacen esto induciendo un conjunto de genes que expresan proteínas capaces de secuestrar el hierro y llevárselo al interior de la célula. También incluirá la formación de biopelículas, fisiología de la pared celular y cambios en el metabolismo primario.

Los genes de respuesta al estrés forman una clase de genes celulares adaptativos. Éstos son un número limitado de conjuntos de genes, todos o parte de los cuales se inducen en respuesta a un amplio rango de estreses. Los

estreses pueden incluir factores fisiológicos (cambios en la temperatura, acidez, oxígeno bajo), factores bióticos (en respuesta a huésped u otra bacteria) y factores químicos (tales como tratamiento con antibióticos).

También se incluyen respuestas a condiciones fisiológicas. Así, las dianas pueden incluir reguladores de la expresión de genes de patogenicidad o factores de virulencia, tales como toxinas. Las dianas también incluyen reguladores de proteínas que determinan la formación de bio-película y captación de nutrientes (por ejemplo, hierro).

5 Los genes de factores de virulencia son aquellos que controlan la producción de moléculas específicas de la bacteria que causan enfermedad, tales como toxinas, o incitan una respuesta del huésped que afecta la capacidad de la bacteria para sobrevivir y causar enfermedad.

10 Las dianas también incluyen reguladores de genes esenciales. Éstos son genes cuya expresión es esencial para la supervivencia celular en las condiciones medioambientales predominantes. Por ejemplo, una diana puede ser un regulador de genes que codifican proteínas que se necesitan para la replicación del ADN, rutas metabólicas principales, síntesis de ácidos grasos o división celular.

Los genes esenciales son aquellos que se requieren para que la bacteria sobreviva en cualquier entorno.

15 Frecuentemente, existe una superposición en la célula entre los sistemas descritos anteriormente. Así, una proteína reguladora puede regular la expresión de genes que codifican factores de virulencia y metabolismo de la pared celular en respuesta a estrés medioambiental. En otro ejemplo, una proteína reguladora puede controlar la expresión de un gen que es esencial para la célula bajo condiciones medioambientales particulares, por ejemplo, escasez de nutrientes.

20 En un aspecto, el presente método puede estar dirigido a genes, la regulación de la expresión de los cuales determina la capacidad de la célula para sobrevivir en presencia de antibióticos generalmente, por ejemplo, más de un antibiótico o más de una clase de antibiótico.

25 Los ejemplos de genes de resistencia a antibióticos están descritos en la solicitud en tramitación con la presente PCT/GB2008/003353. Los señuelos tales como los descritos en la presente memoria pueden usarse para tomar como diana uno o más de los genes en PCT/GB2008/003353 que codifican beta lactamasas, bombas de eflujo, por ejemplo, las de la Figura 1, enzimas que modifican aminoglicósido o gen ermB, con el fin de alterar, por ejemplo, incrementar, la resistencia a antibióticos. De hecho, los señuelos pueden contener dos o más secuencias dirigidas para actuar en más de un gen o factor de transcripción y/o más de una cepa bacteriana. Por ejemplo, un señuelo puede comprender el conjunto de unión Sig de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.

30 Los TFD pueden usarse para tratar una variedad de infecciones bacterianas en el sitio que ocurran en el cuerpo humano. Pueden describirse cinco áreas generales de infección bacteriana. Las infecciones del tracto respiratorio están entre las más comunes, las infecciones del tracto respiratorio superior incluyendo los oídos, garganta y senos nasales que pueden tratarse con aplicaciones tópicas o preparaciones de aerosol. Las infecciones del tracto inferior incluyen neumonía (que está causada por un rango de patógenos bacterianos, bronquitis y complicaciones infecciosas de la fibrosis quística. Un problema común tanto en la práctica de comunidad como de hospital son las infecciones del tracto urinario, en las que la orina se infecta y se necesitan antibacterianos que entren en la vejiga, próstata, uretra y riñones. El intestino es vulnerable a infecciones (un ejemplo de infecciones gastrointestinales), en las que las bacterias causan enfermedad bien por invasión mucosal o producción de toxinas, un ejemplo de la cual incluye epidemia de cólera y cuando se usan antibióticos se ingieren o se administran intravenosamente. Las infecciones de la piel y del tejido blando, que pueden tratarse por aplicaciones tópicas, son comunes después de lesión traumática o quemaduras, que permiten la colonización e ingresión de microorganismos que resulta en infecciones que están localizadas o se diseminan rápidamente a través de los tejidos. Los microbios responsables de las infecciones de la piel surgen frecuentemente de la flora normal de la piel, tal como *Streptococcus pyogenes* causando infecciones superficiales en la piel (impétigo), celulitis (infección asentada más profundamente que puede diseminarse en la sangre) y fascitis necrosante, una infección que progresó rápidamente que frecuentemente es un riesgo para la vida. Finalmente, las infecciones del sistema nervioso central, tales como meningitis bacteriana, son quizás las más exigentes para tratar ya que las terapias deben penetrar la barrera hemato-encefálica, como deben hacerlo también las bacterias patogénicas.

35 Los señuelos pueden prepararse y ensayarse como se describe en la solicitud en tramitación con la presente PCT/GB2008/003353.

40 Uno cualquiera o más de los aspectos anteriores pueden combinarse cuando se consideran los presentes métodos.

45 Los presentes métodos usan polinucleótidos señuelo para alterar la expresión génica en procariotas. Un polinucleótido señuelo comprende un sitio de unión de factor de transcripción (secuencia señuelo). Generalmente, en los presentes métodos, se introduce un polinucleótido señuelo en una célula diana, que comprende un gen o genes unidos operativamente a una secuencia reguladora en *cis* que comprende un sitio de unión para el factor de transcripción. El polinucleótido titula el factor de transcripción del sitio de unión celular y altera la regulación de la

expresión del gen o genes unidos operativamente en la célula. La alteración de la expresión génica causa cambios en los fenotipos celulares.

Los factores de transcripción y genes que pueden tomarse como diana usando los presentes métodos incluyen aquellos descritos en la presente memoria y en la solicitud en tramitación con la presente PCT/GB2008/003353. Los ejemplos específicos incluyen los reguladores y secuencias reguladoras siguientes que también se listan en la Figura 2.

La referencia a cada uno de los reguladores específicos incluye referencia a ese regulador en las especies listadas y a cualquier homólogo de especie de éstas. Para cada diana, se presenta un sitio de unión nativo y/o una secuencia de unión consenso. Una secuencia señalada dirigida al regulador puede comprender la secuencia nativa o secuencia consenso presentada o una variante o fragmento de ésta que tiene función señalada como se describe en la presente memoria, por ejemplo, un sitio de unión nativo en otra especie. Los métodos para ensayar una secuencia variante para función señalada se describen en la solicitud en tramitación con la presente PCT/GB2008/003353. Los señuelos dirigidos a un regulador particular son particularmente adecuados para uso en procariotas en los que aparece el regulador, como se lista más adelante. También se listan para cada regulador ejemplos de usos de señuelos dirigidos al regulador, por ejemplo, antibióticos para los que una célula se vuelve típicamente más susceptible después de tratamiento con un señuelo.

Las secuencias proporcionadas en la presente memoria ilustran cadenas únicas de los sitios de unión. Sin embargo, se apreciará que en la naturaleza y en los TFD de la presente invención, las secuencias serán bicatenarias. La cadena complementaria a las secuencias listadas en la presente memoria son claramente y fácilmente derivables, por ejemplo de Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3^a Edición), 2001 por Joseph Sambrook y David Russell.

WhiB7

WhiB7 es un regulador transcripcional de genes de resistencia a antibióticos en Actinomycetes incluyendo Mycobacteria (por ejemplo, *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*) y Streptomyces (Nguyen et al, Trends in Microbiology (2006) 14: 304-312).

El sitio de unión de WhiB7 nativo en *M. smegmatis* cepa MC2 155 comprende:

**5'- CACCAGCCGA AAAGGCCACG GACCCGCAGT CACCCGGATC CGTGGCCATT
TTTGTGGGAC CCCCGAGAA ATCTGGTCGC AGGATCCATC AGCTCAGACA
GATCAC- 3' (SEQ ID NO: 9)**

LOCUS CP000480 6988209 pb ADN circular BCT 12-DIC-2006 DEFINICIÓN *Mycobacterium smegmatis* cepa MC2 155, genoma completo.

REGISTRO CP000480

VERSIÓN CP000480.1 GI: 118168627

COORDENADAS 20313637-2031742

Usos: incrementar la eficacia de un amplio rango de antibióticos hidrofilicos/hidrofóbicos, incluyendo macrólidos, lincosamidas, cloranfenicol, imipenem, pristinamicina, rifampicina, estreptomicina, espectinomicina, tetraciclina, isoniazid, etambutol.

Un ejemplo de una secuencia TFD WhiB7 comprende:

**WhiB7 TFD 5' TGG CCA CGG ATC CGG GTG ACT GCG GGT CCG TGG CCT 3'
(SEQ ID NO: 5; Ejemplo 2)**

FadR

FadR es un regulador de la expresión de genes en una ruta esencial para la síntesis de ácidos grasos (incluyendo fabA y fabB) en *E. coli* (Campbell y Cronan, J. Bacteriology (2001) 183: 5982-5990).

El sitio de unión de FadR nativo en *E. coli* K12 comprende la secuencia:

**5' AGTAAGTTTC GAATGCACAA TAGCGTACAC TTGTACGCCG AACAAAGTCCG
ATCAGGCCATT TAA-3' (SEQ ID NO: 10)**

LOCUS CP000948 4686137 pb ADN circular BCT 05-JUN-2008

DEFINICIÓN Escherichia coli cepa K12 sustrato DH10B, genoma completo.

REGISTRO CP000948

VERSIÓN CP000948.1 GI: 169887498

5 COORDENADAS 2531419-2531481

Usos: Incrementar la eficacia de cualquier antibiótico dirigido a la síntesis de ácidos grasos, tales como: platenesimicina, derivados de platenecina, ácido fomalénico, corituberina, sulfonas cíclicas, derivados del ácido antranílico, ácido cerulénico.

Un ejemplo de una secuencia TFD FadR comprende

**FabB TFD 5' TTT ATT CCG AAC TGA TCG GAC TTG TTC AGC GTA CAC GTG TTA
GCT ATC CTG CGT GCT TCA 3'.**

10 **(SEQ ID NO: 6; Ejemplo 3)**

YycG/YycF

YycG/YycF es un regulador de dos componentes en bacterias gram positivas bajas en G+C, incluyendo *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Listeria monocytogenes*. Se sabe que YycG/YycF es un regulador esencial de al menos 12 genes, incluyendo LytM y SsaA y también genes para la determinación de la virulencia y la síntesis de la pared celular (Dubrac y Msadek, Journal of Bacteriology (2004) 186: 1175-1181).

Los sitios de unión nativos para YycF e YycG en *S. aureus* (en los promotores LytM y Ssa) comprenden:

YycF_LytM

5'- GCTATTTGTAATGACAATGTAATGAGTTAGTAAAAA-3' (SEQ ID NO: 11)

20 LOCUS CP000730 2872915 pb ADN circular BCT 16-NOV-2007 DEFINICIÓN *Staphylococcus aureus* subesp. *aureus* USA300_TCH1516, genoma completo.

REGISTRO CP000730

VERSIÓN CP000730.1 GI: 160367075

COORDENADAS 322073-322109

YycF_SsaA

25 **5'- ATTACAAATTGTAACAGACTTATTTA-3' (SEQ ID NO: 12)**

LOCUS CP000730 2872915 pb ADN circular BCT 16-NOV-2007 DEFINICIÓN *Staphylococcus aureus* subesp. *aureus* USA300_TCH1516, genoma completo.

REGISTRO CP000730

VERSIÓN CP000730.1 GI: 160367075

30 COORDENADAS 2415067-2415093

Usos: Incrementar la eficacia de antibióticos macrólido-lincosamida-estreptogramina B (MLSB)

Los ejemplos de una secuencia TFD de YycG/YycF incluyen:

LytM TFD 5' GCT ATT TTG TAA TGA CAA TGT AAT GAG TTT AGT AAA AA 3'

SsaA TFD 5' ATT ACA AAT TTG TAA CAG ACT TAT TTT A 3'.

(SEQ ID NOs 7 y 8; Ejemplo 4)

Sigma 54 o Sig^B

Sigma 54 o Sig^B es un controlador principal de la respuesta adaptativa y aparece en aproximadamente 60% de las bacterias, incluyendo *M. smegmatis*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* (Wigneshweraraj, Molecular Microbiology (2008) 68: 538-546).

- 5 Los sitios de unión nativos en *S. aureus* y *K. pneumoniae* comprenden:

SA_sig

5'- TTATTATATA CCCATCGAAA TAATTTCTAA TCTTC-3' (SEQ ID NO: 13)

LOCUS CP000730 2872915 pb ADN circular BCT 16-NOV-2007 DEFINICIÓN *Staphylococcus aureus* subesp. *aureus* USA300_TCH1516, genoma completo.

- 10 REGISTRO CP000730

VERSIÓN CP000730.1 GI: 160367075

COORDENADAS 2187051-2187017

KP_sig

5'- CCGATAAGGG CGCACGGTT GCATGGTTAT-3' (SEQ ID NO: 14)

- 15 LOCUS X13303 24206 pb ADN lineal BCT 18-ABR-2005 DEFINICIÓN ADN de *Klebsiella pneumoniae* para el agrupamiento de genes nif.

REGISTRO X13303

VERSIÓN X13303.1 GI: 43820

COORDENADAS 18301-18330

- 20 Usos: Incrementar la eficacia de antibióticos bactericidas y bacteriostáticos, por ejemplo, los descritos en la presente memoria.

Fur

- 25 La regulación de Fur se describió inicialmente como que era importante para la regulación del hierro pero cada vez se admite más que está implicado en otras rutas adaptativas, más especialmente metaloreguladoras (Zn-Zur) y también en la determinación de la resistencia a peroxidasa (Per). La regulación de Fur ocurre en al menos *S. aureus*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *B. subtilis* (Fur, PerR, Zur, MntR), (Horsburgh 2001; Lavarr 2003; y Delany 2001).

Una secuencia consenso para la unión de Fur en *S. aureus* y *E. coli* comprende:

SA_fur

5'- ACT ACA AGT ACT ATT AGT AAT AGT TAA CCC TT-3' (SEQ ID NO: 15)

- 30 Secuencia consenso ("CAJA Fur") como se describe en Horsburgh, J. Bacteriology (2001) 183: 468.

EC_fur

5'- GATAATGATAATCATTATC-3' (SEQ ID NO: 16)

Secuencia consenso como se describe en de Lorenzo, J. Mol. Biol. (1998) 283: 537.

Una secuencia de unión nativa en *H. pylori* comprende:

- 35 HP_fur

5'- GTT GTC CCA TAA TTA TAG CAT AAA TGA TAA TGA AAA AGT AAA-3' (SEQ ID NO: 17)

LOCUS CP001072 1608548 pb ADN circular BCT 12-JUN-2008

DEFINICIÓN *Helicobacter pylori* Shi470, genoma completo.

REGISTRO CP001072

VERSIÓN CP001072.2 GI: 189491895

COORDENADAS 691415-691374

5 Usos: Incrementar la eficacia de antibióticos en general que pueden inducir estrés (bactericidas). Los señuelos Fur pueden usarse sin antibiótico para perturbar los mecanismos de respuesta al estrés y adaptación medioambiental.

TcdR

10 TcdR es un factor sigma alternativo que está autorregulado y que regula la expresión de dos exotoxinas principales que determinan virulencia. Se sabe que la regulación de TcdR ocurre en *Clostridium difficile*, *C. botulinum* (en el que el homólogo es BotR), *C. tetani* (TetR) y *C. perfringens* (UviA) (Matamoros, Molecular Microbiology (2007) 64: 1274-1288)

Un sitio de unión consenso en *C. difficile* comprende:

TcdR

5'- AAG TTT ACA AAA TTA TAT TAG AAT AAC TTT TTT A TT-3' (SEQ ID NO: 18)

15 Secuencia consenso (TcdR, en el que las cajas -35 y -10 están subrayadas) como se describe en Dupuy, Mol. Micro. (2006) 55: 1196.

Usos: Incrementar la eficacia de muchos antibióticos más especialmente aquellos con propiedades bacteriostáticas.

Vfr

20 Vfr es un regulador global de los factores de virulencia en *P. aeruginosa* y *E. coli* (Kanack, Microbiology (2006) 152: 3485-3496). El homólogo de *E. coli* es CRP, con sitios de unión que aparecen en el promotor del gen *toxA* y promotor P1 del gen *regA*.

Un consenso y dos sitios de unión nativos en *P. aeruginosa* son:

PA_Vfr

5'- AAA TGT GAT CTA GAT CAC ATT T-3' (SEQ ID NO: 19)

Secuencia consenso como se describe en Kanack, Microbiol. (2006) 55: 1196.

25 PA_ToxA

5'- CACTCTGCAA TCCAGTTCAT AAATCC-3' (SEQ ID NO: 20)

LOCUS EU595736 26 pb ADN lineal BCT 15-JUN-2008 DEFINICIÓN *Pseudomonas aeruginosa* cepa PACS458 clon fa1366, secuencia completa.

REGISTRO EU595736 REGIÓN: 10145..10170

30 VERSIÓN EU595736.1 GI: 187939551

COORDENADAS 10145-10170

PA_RegA

5'- GTAACAGCGGAACCACTGCACAG -3' (SEQ ID NO: 21)

35 LOCUS EU595736 26 pb ADN lineal BCT 15-JUN-2008 DEFINICIÓN *Pseudomonas aeruginosa* cepa PACS458 clon fa1366, secuencia completa.

REGISTRO EU595736 REGIÓN: 10145..10170

VERSIÓN EU595736.1 GI: 187939551

COORDENADAS 312-334

Antibióticos: Los señuelos pueden usarse sin antibiótico para controlar la expresión de un conjunto de genes que determina virulencia en *P. aeruginosa* y *E. coli*. Los señuelos pueden usarse para incrementar la eficacia de antibióticos más especialmente aquellos con propiedades bacteriostáticas.

NtrC

- 5 NtrC es un regulador de un gen esencial, *glnA*, que se requiere para la adaptación medioambiental en al menos *Klebsiella pneumoniae* (Minchin et al, The EMBO Journal (1989) 8: 3491-3499).

Un sitio de unión nativo en *K. pneumoniae* comprende:

KP_NtrC

5'- GCTTTGCACTACCGCGGCCATCCCTGCCCAAAACGATCGCT -3' (SEQ ID NO: 22)

- 10 LOCUS X 13303 24206 pb ADN lineal BCT 18-ABR-2005 DEFINICIÓN ADN de *Klebsiella pneumoniae* para el agrupamiento de genes nif.

REGISTRO X 13303

VERSIÓN X13303.1 GI: 43820

COORDENADAS 18159-18201

- 15 Usos: Los señuelos pueden usarse sin antibiótico para perturbar la expresión del gen esencial, *glnA*, requerido para la adaptación medioambiental, o en combinación con antibióticos en general que pueden inducir estrés (bactericidas).

ArsR

- 20 ArsR es un regulador de genes que codifican adaptación a ácido en al menos *Helicobacter pylori*, *H. acireonchis* y *H. felis* (Pflock et al, J. Bacteriology (2006) 188: 3449-3462). Los sitios de unión aparecen en el promotor amiE y el promotor rocF como se describe en Pflock et al.

Los ejemplos de una secuencia de unión nativa comprenden:

HP_AmiE

**5'- ATAATCATAA TGATTAAAGT TTTCATATTTC ATTATAAACCGTTTACACA
ATTATT -3' (SEQ ID NO: 23)**

- 25 LOCUS AE000511 56 pb ADN lineal BCT 27-DIC-2005 DEFINICIÓN *Helicobacter pylori* 26695, genoma completo.

REGISTRO AE000511 REGIÓN: 310910..310965

VERSIÓN AE000511.1 GI: 6626253

COORDENADAS 310910-310965

HP_RocF

**5'- GAAATTGTTC TATTATTAT CCATTGCTT ATTAATAATT GGTTGTTAAT
TTGGTTTAG A -3' (SEQ ID NO: 24)**

- 30 LOCUS AE000511 61 pb ADN lineal BCT 27-DIC-2005 DEFINICIÓN *Helicobacter pylori* 26695, genoma completo.

REGISTRO AE000511 REGIÓN: 1459830..1459890

VERSIÓN AE000511.1 GI: 6626253

COORDENADAS 1459830-1459890

- 35 Usos: Los señuelos pueden usarse por sí mismos para perturbar la expresión de los genes esenciales que median la captación de hierro que se requieren para la adaptación medioambiental, o en combinación con antibióticos en general que pueden inducir estrés (bactericidas).

Secuencia consenso resistente a glicopéptido (GISA)

Se determinó una secuencia consenso por análisis bioinformático de datos de micromatrices no patentadas. Se encontraron restos en genes que se mostró que estaban regulados al alza cuando se compara una cepa resistente a glicopéptido con su parental, y la misma cepa resistente con un revertante (Scherl, BMC Genomics (2006) 7: 296).

5 Se encontró que 17/22 promotores tenían una secuencia consenso compartida.

Un ejemplo de la secuencia consenso, encontrado en el promotor de *tcaA*, un regulador positivo conocido de virulencia (Maki, Antimicrobial Agents Chemother. (2004) 48: 1953) puede usarse en un señuelo (véase más adelante).

SA_TcaA

10 **5'-TGAACACCTTCTTTTA -3' (SEQ ID NO: 25)**

LOCUS CP000730 2872915 pb ADN circular BCT 16-NOV-2007 DEFINICIÓN *Staphylococcus aureus* subesp. *aureus* USA300_TCH1516, genoma completo.

REGISTRO CP000730

VERSIÓN CP000730.1 GI: 160367075

15 COORDENADAS 2476452-2476436

La secuencia consenso aparece al menos en *S. aureus*. Los señuelos dirigidos a la secuencia pueden usarse para tomar como diana cualquiera de las proteínas reguladoras que se unen a las secuencias en los promotores nativos. Típicamente, los genes regulados por unión a las secuencias nativas contribuyen a la resistencia a glicopéptidos y/o virulencia.

20 *Usos:* los señuelos pueden usarse para incrementar la eficacia de antibióticos glicopeptídicos.

AgrA

Se determinó una secuencia consenso por análisis bioinformático de datos de micromatrices no patentadas .Se encontraron restos en genes que se mostró que estaban regulados positivamente por Agr, un regulador asociado con virulencia (Dunman, J. Bacteriol. (2001) 183: 7341).

25 Se encontró que el resto potencial aparecía en dos promotores que se pensó que estaban probablemente implicados en la determinación de la patogenicidad (SA2093 en 5' de un regulador transcripcional semejante a AraC y SA1269, un gen semejante a Bit).

SA_Agr_2093

5'-AGA AAG ACA AAC AGG AGT AA -3' (SEQ ID NO: 26)

30 LOCUS CP000730 2872915 pb ADN circular BCT 16-NOV-2007 DEFINICIÓN *Staphylococcus aureus* subesp. *aureus* USA300_TCH1516, genoma completo.

REGISTRO CP000730

VERSIÓN CP000730.1 GI: 160367075

COORDENADAS 2414790-2414771

35 SA_Agr-1269

5'-GAA GAA ACA AAA AGC AGC AT -3' (SEQ ID NO: 27)

LOCUS AP009324 2880168 pb ADN circular BCT 09-ENE-2008 DEFINICIÓN *Staphylococcus aureus* subesp. *aureus* ADN Mu3, genoma completo.

REGISTRO AP009324

40 VERSIÓN AP009324.1 GI: 156720466

COORDENADAS 1549580-1549561

El resto se unión aparece al menos en *S. aureus* y contiene homólogos en muchas especies Gram-negativas, tales como *P. aeruginosa* y *E. coli*. Los señuelos dirigidos al resto pueden usarse para tomar como diana cualquier

proteína reguladora que se une al resto en los promotores nativos. Típicamente, los genes regulados por la unión a las secuencias nativas determinan virulencia en la célula.

Usos: Los señuelos pueden usarse para controlar la expresión de un conjunto de genes que determina virulencia en *P. aeruginosa* y *E. coli*.

5 Generalmente, la secuencia señuelo (sitio de unión del factor de transcripción) en el polinucleótido no está unida operativamente a un gen. El sitio de unión del factor de transcripción puede aislarse de cualesquiera otros elementos de un promotor afín.

El polinucleótido señuelo puede comprender un vector plasmídico. Por ejemplo, el polinucleótido señuelo puede 10 comprender un plásmido n[snare] como se describe en la solicitud en tramitación con la presente PCT/GB2008/003353 y/o prepararse según un método descrito en la solicitud en tramitación con la presente PCT/GB2008/003353.

El polinucleótido señuelo puede comprender más de una copia de la secuencia señuelo. El polinucleótido puede 15 comprender una molécula multimérica que comprende múltiples copias de la secuencia señuelo. Por ejemplo de 1 a 1.000 copias. Típicamente, hay dos o más copias, por ejemplo, 2-1.000 copias, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ó 900 copias. Por ejemplo puede haber 10-200, 10-150, 20-120, 20-100, 30-100, 30-80, 30-50, 30-40 copias. Por ejemplo, puede haber 30 copias de la secuencia señuelo. Típicamente, hay múltiples copias del señuelo, por ejemplo, múltiples repeticiones directas de la secuencia señuelo.

Alternativamente, el polinucleótido señuelo puede comprender más de una secuencia señuelo así como múltiples copias de las secuencias señuelo.

20 El polinucleótido señuelo puede comprender secuencias adicionales además de la secuencia señuelo. Típicamente, la secuencia adicional resulta en una resistencia incrementada a la degradación de la secuencia señuelo debido a la acción de exo y/o endonucleasas. El polinucleótido señuelo puede comprender al menos un elemento de estructura secundaria. Típicamente, esta estructura secundaria resulta en resistencia incrementada a la degradación de la secuencia señuelo debido a la acción de exo y/o endonucleasas. El polinucleótido señuelo puede comprender bases 25 o azúcares modificados para conferir resistencia mayor a nucleasa. El polinucleótido señuelo puede comprender nucleótidos 2' OH o aminas en el extremo del polinucleótido para reducir o inhibir la actividad exonucleasa. El polinucleótido señuelo puede comprender un oligonucleótido lineal. El polinucleótido señuelo puede comprender ADN bicatenario circular, por ejemplo, una configuración denominada en forma de mancuerna. (Ahn et al, Biochemical Biophysical Res. Comm. (2003) 310: 1048-1053). Una mancuerna típicamente tiene una región 30 bicatenaria que incorpora la secuencia diana flanqueada por pequeñas estructuras en horquilla, u otras secuencias. El polinucleótido señuelo puede comprender una modificación de colesterol en uno o en cada uno de los extremos 5' de la molécula.

El polinucleótido señuelo puede comprender una cualquiera o más de las características anteriores en cualquier combinación adecuada.

35 Un polinucleótido señuelo puede comprender cualquiera de las secuencias señuelo descritas en la presente memoria y/o identificadas según los métodos descritos en la solicitud en tramitación con la presente PCT/GB2008/003353 y también pueden comprender secuencia adicional como se describe.

Como anteriormente, un polinucleótido señuelo puede comprender un plásmido n [snare]. Los plásmidos tienen la 40 ventaja, por ejemplo, comparado con los oligonucleótidos lineales, de que se introducen fácilmente en bacterias, pueden mantenerse por selección positiva y eluden el problema de la degradación por exonucleasa.

Las ventajas de crear versiones portadas por plásmidos de oligonucleótidos señuelo incluyen coste de fabricación reducido, resistencia incrementada a degradación *in vivo* por nucleasas, mantenimiento de la concentración de plásmido (por auto-replicación y selección positiva si es necesario), amplio rango de huéspedes y la capacidad de ensayar combinaciones o secuencias reguladoras en *cis* usando plásmidos n [snare] distintos pero compatibles 45 (para ensayar para efectos sinérgicos).

Un plásmido n [snare] es adecuado para uso como un polinucleótido señuelo en los presentes métodos. Los plásmidos y bibliotecas n [snare] también son adecuados para ensayar una función señuelo posible de una secuencia reguladora en *cis* conocida o potencial, o para cribar nuevas secuencias reguladoras en *cis* (que pueden actuar como secuencias señuelo).

50 El principio de uso de un plásmido n [snare] se ilustra en la Figura 3. El plásmido comprende una secuencia "snare" (mostrada en múltiples copias en la Figura). Si la "snare" comprende un sitio de unión de factor de transcripción que compite con una secuencia reguladora en *cis* celular para unión a un factor de transcripción (es decir, tiene función señuelo), la introducción del plásmido n [snare] en la célula resultará en una liberación del factor de transcripción de la secuencia reguladora en *cis* celular y en la snare. Esto puede detectarse como un cambio en la expresión de un 55 gen o genes cuya expresión está regulada en la célula por esa secuencia reguladora en *cis* o por la alteración del fenotipo de la célula.

En general, un plásmido n [snare] comprende un vector plasmídico y una secuencia inserto (comprendiendo el inserto la snare). La incorporación de la secuencia snare en un plásmido aborda los problemas en la técnica de la degradación del señuelo y permite el mantenimiento estable del señuelo (y cualquier efecto en la expresión génica) en la célula.

- 5 La secuencia inserto comprende una o más copias de una secuencia monomérica (que comprende la snare). Así, el inserto puede comprender (por ejemplo) de 1 a 200 secuencias monoméricas. Típicamente, hay dos o más copias, por ejemplo, 2-200 copias, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 ó 190 copias. Por ejemplo, puede haber 5-200, 5-150, 5-100, 10-150, 10-50, 5-50, 5-40, 10-40, 5-30 copias. Por ejemplo, puede haber 30 copias de la secuencia monomérica. El plásmido comprende típicamente un homopolímero del monómero. Típicamente, hay múltiples copias del monómero, por ejemplo, múltiples repeticiones directas de la secuencia monomérica. El proporcionar múltiples copias del monómero (y así de la snare) incrementa el poder de titulación del señuelo.

La secuencia monomérica comprende la secuencia snare.

- 15 Típicamente, un sitio de unión de un factor de transcripción en una snare no está unido operativamente a un gen, por ejemplo, en la snare o plásmido snare. En este sentido, el sitio de unión se aísla de su gen o genes afines. Un sitio de unión en una snare también puede aislarse de otros elementos en su promotor afín. En un caso, la secuencia monomérica no comprende un gen.

- 20 Un monómero puede comprender secuencia adicional además de la snare. Habitualmente, dicha secuencia adicional deriva del método usado para producir la snare y/o el inserto del plásmido. Por ejemplo, un monómero puede comprender una secuencia adaptadora, tal como la secuencia adaptadora que resulta típicamente cuando se producen snare "personalizadas" para una biblioteca de n [snare] personalizada según los métodos de la presente memoria. Una secuencia adaptadora puede comprender, por ejemplo, sitios de reconocimiento y/o corte para una o más enzimas de restricción.

- 25 Un monómero puede comprender una secuencia de nucleótidos que proporciona un sitio de unión para un cebador, por ejemplo, un cebador usado en la producción del monómero o de un inserto que comprende múltiples monómeros.

- 30 Por ejemplo, cuando un inserto de plásmido se prepara usando un método de amplificación por círculo rodante como se describe en la solicitud en tramitación con la presente PCT/GB2008/003353, un monómero comprende típicamente un segmento que corresponde al sitio de unión para el cebador usado en la replicación por círculo rodante, por ejemplo un cebador T7.

Un monómero que comprende una secuencia snare aleatorizada también comprende típicamente una región o regiones de secuencia constante. Por ejemplo, una secuencia snare aleatorizada de n nucleótidos puede estar flanqueada por regiones de secuencia constante. Alternativamente, un núcleo central de secuencia constante puede estar flanqueado por regiones de secuencia de nucleótidos aleatorizados.

- 35 La longitud de un monómero puede ser, por ejemplo, hasta 1.000 nucleótidos, por ejemplo, hasta 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15 ó 10 nucleótidos. Típicamente, la longitud del monómero está en el intervalo, por ejemplo, de 10-100, 10-50, 20-75, 30-60, 30-50, 35-55 tal como 35-54 nucleótidos. Por ejemplo, la longitud de un monómero puede ser 30, 40 ó 50 nucleótidos.

- 40 Una parte snare de un monómero puede variar típicamente en tamaño de 10-30 nucleótidos, por ejemplo, 10-25, 10-20, 15-20, tal como 15, 16, 17, 18, 19 ó 20, por ejemplo, 19 nucleótidos.

Una secuencia adaptadora puede comprender, por ejemplo, 5-30 nucleótidos, por ejemplo, 5-25, 5-20, 5-15 ó 5-10 , nucleótidos tal como 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 nucleótidos.

- 45 Típicamente, un inserto en el plásmido n [snare] comprende una o más copias de un monómero como se describe en la presente memoria. Cuando el inserto comprende múltiples repeticiones de un monómero, éstas pueden ser repeticiones en tandem.

Un inserto en el vector plasmídico puede comprender, por ejemplo, aproximadamente 1,5 kb, por ejemplo, 1-2 kb, por ejemplo 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7 ó 1,8 kb. Sin embargo, puede usarse cualquier tamaño de inserto adecuado, que permita el mantenimiento estable del plásmido en una célula huésped adecuada y uso eficaz en los presentes métodos.

- 50 Típicamente, las secuencias de todos los monómeros en un único plásmido son las mismas.

El vector plasmídico para uso en el plásmido n [snare] puede ser adecuado para uso en un huésped procariota o eucariota. Por ejemplo, el vector puede ser para uso en un procariota tal como un huésped bacteriano, por ejemplo, actinomicete. Por ejemplo, el vector plasmídico puede ser adecuado para uso en una cepa de *Streptomyces* o *E. coli*, por ejemplo una o más de *Streptomyces coelicolor*, por ejemplo, A3(2) (o cepa M145 o M600), *E. coli*.

Streptomyces lividans o *Streptomyces cinnamoneous*. Los huéspedes adecuados se describen adicionalmente en la presente memoria.

Típicamente, el vector es un vector de amplio rango de huéspedes y/o lanzadera y puede por lo tanto mantenerse y propagarse en más de un huésped. El plásmido puede ser un plásmido conjugativo. Esto permite una transferencia fácil de una célula a otra por conjugación.

5 Preferiblemente, el plásmido es auto-replicativo. Típicamente, el plásmido es un plásmido de alto número de copias.

Por ejemplo, el plásmido puede mantenerse a, por ejemplo, 20-100 copias por célula, por ejemplo 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 95 ó 100 copias por célula. El alto número de copias incrementa el poder de titulación de una secuencia señal en la snare.

10 Típicamente, un plásmido n [snare] comprende un origen de replicación. Los orígenes adecuados se conocen en la técnica. Típicamente, el plásmido comprende además uno o más genes marcadores detectables, por ejemplo, uno o más genes que codifican resistencia a antibióticos, por ejemplo, el gen *aac* que codifica resistencia a apramicina. La expresión del gen o genes marcadores permite el cribado para el mantenimiento del plásmido en una célula huésped.

15 Los ejemplos de vectores plasmídicos adecuados incluyen por ejemplo, pIJ86. Los vectores adecuados se conocen en la técnica.

Una snare puede comprender una secuencia derivada o aislada de un genoma o fragmento genómico. Un fragmento genómico puede comprender un gen o genes que codifican una función o fenotipo particular de interés. Una snare

20 puede comprender, por ejemplo, una secuencia derivada o aislada de la región promotora de dicho gen o genes o secuencias circundantes, por ejemplo, secuencias a una distancia mayor de un gen o genes que el promotor. Una snare puede comprender una secuencia que compite con dicha secuencia para unión del factor de transcripción, como se describe en la presente memoria. Los métodos para preparar dichas snares se describen en la presente memoria y en la solicitud en tramitación con la presente PCT/GB2008/003353.

Los polinucleótidos señal en la snare pueden prepararse por cualquier método adecuado.

25 Por ejemplo, las estructuras en forma de mancuerna pueden prepararse como oligonucleótidos lineales y ligarse con ligasa T4. Alternativamente, los señuelos en forma de mancuerna pueden prepararse por PCR usando cebadores apropiados, como se describe en el Ejemplo 1. Cada cebador contiene generalmente una parte que formará la horquilla de la estructura en forma de mancuerna. Los ejemplos de dichos cebadores se proporcionan en el Ejemplo 1. La amplificación por PCR usando los cebadores está seguida típicamente de digestión por restricción del producto de amplificación y ligación para formar la estructura en forma de mancuerna circular cerrada.

Alternativamente, las estructuras en forma de mancuerna pueden prepararse por digestión de restricción de un plásmido como se describe en el Ejemplo 1. La digestión está seguida de ligación para formar la estructura en forma de mancuerna circular cerrada.

35 Los métodos para preparar plásmidos n [snare] y bibliotecas de plásmidos n [snare] se describen en la presente memoria y en la solicitud en tramitación con la presente PCT/GB2008/003353.

Los presentes métodos pueden comprender la introducción de más de una secuencia señal en una célula. Por ejemplo, puede usarse una mezcla de secuencia señal, que comprende secuencias variantes para unión de un regulador en diferentes cepas, por ejemplo, diferentes cepas clínicas. Las secuencias señal pueden estar presentes en la mezcla en las mismas proporciones en las que aparecen las diferentes cepas en la clínica. En otro ejemplo, puede tomarse como diana más de un regulador.

40 En un aspecto, los métodos descritos en la presente memoria comprenden métodos *in vitro*.

Una célula huésped como se refiere en la presente memoria puede ser una en la que se desea alterar la expresión génica (y fenotipo) usando una molécula señal, por ejemplo, una bacteria patogénica.

45 Típicamente, cuando el método se usa para alterar el fenotipo de una célula, las células huésped presentan el fenotipo en ausencia del señal. Los señuelos para la alteración de un fenotipo médica o terapéuticamente relevante, por ejemplo, para incrementar la sensibilidad a antibióticos, pueden cribarse en una serie de células. Por ejemplo, los señuelos pueden ensayarse en primer lugar en un modelo bacteriano del fenotipo, por ejemplo, un modelo de resistencia a antibióticos y validarse adicionalmente, por ejemplo, en un aislado patógeno o clínico. Los señuelos pueden validarse adicionalmente en un modelo animal, por ejemplo, un modelo de ratón.

50 Cuando un señal es un plásmido, típicamente la célula huésped es compatible con el vector plasmídico y/o es una en la que el plásmido puede mantenerse de manera estable y replicarse. La célula huésped también es típicamente compatible con cualquier gen marcador detectable en el plásmido.

En general, una célula huésped comprende la secuencia reguladora en *cis* de interés, es decir, la secuencia reguladora en *cis* que se está cribando o con la que se pretende que compita la secuencia señuelo introducida en la célula, unida operativamente a un gen o genes. La modulación de la expresión del gen o genes puede detectarse, directamente o indirectamente (por ejemplo, por una alteración en el fenotipo).

- 5 Típicamente, la célula comprende un promotor que contiene la secuencia reguladora en *cis*, unido operativamente al gen o genes. Por unido operativamente se quiere decir que la secuencia reguladora en *cis* y/o el promotor está unido al gen o genes de manera tal que la secuencia y/o promotor puede funcionar (en condiciones apropiadas, por ejemplo presencia del factor o factores de transcripción requeridos) para regular la expresión del gen o genes. Así, cuando se une un factor de transcripción afín, la secuencia reguladora en *cis* funciona para regular (reprimir o activar) la expresión del gen o genes.

El funcionamiento de la secuencia reguladora en *cis* en la célula puede determinarse monitorizando la expresión del gen o genes unidos. Esto puede hacerse monitorizando la expresión del gen directamente o monitorizando la expresión de un fenotipo particular que está asociado con la expresión el gen o genes. Por ejemplo, el cribado para función puede comprender el cribado para resistencia a uno o más antibióticos, para respuesta al estrés, para expresión de factores de virulencia o para expresión de genes esenciales. Los métodos para cribar se describen en la solicitud en tramitación con la presente PCT/GB2008/003353.

15 Una célula huésped puede comprender una secuencia reguladora en *cis* (por ejemplo, un promotor que contiene la secuencia) unida operativamente a su gen o genes nativos (afines), es decir, unida al gen o genes cuya expresión regula la secuencia (o promotor) en su estado nativo. La secuencia reguladora en *cis* y el gen o genes regulados pueden ser endógenos para la célula, por ejemplo, genes que codifican un mecanismo intrínseco de resistencia en una bacteria patogénica resistente a antibiótico.

20 Las células huésped adecuadas se conocen en la técnica y se describen en la presente memoria en los presentes Ejemplos.

25 Los presentes métodos son adecuados para uso en procariotas generalmente. En particular, los métodos pueden usarse en patógenos, especialmente bacterias patogénicas, por ejemplo, bacterias patogénicas que afectan a los seres humanos. Éstas incluyen bacterias de los géneros siguientes (listadas según el resultado en el ensayo de tinción de Gram):

Gram negativas: *Acinetobacter*; *Bordetella*; *Borrelia*; *Brucella*; *Campylobacter*; *Escherichia*; *Francisella*; *Haemophilus*; *Helicobacter*; *Klebsiella*; *Legionella*; *Leptospira*; *Neisseria*; *Proteobacteria*; *Pseudomonas*; *Rickettsia*; *Salmonella*; *Shigella*; *Treponema*; *Vibrio*; *Yersinia*.

30 Gram positivas: *Bacillus*; *Clostridium*; *Corynebacterium*; *Enterococcus*; *Listeria*; *Mycobacterium*; *Staphylococcus*; *Streptococcus*.

No teñidas: *Chlamydia*; *Mycoplasma*.

35 Los ejemplos de especies patogénicas gram negativas y de enfermedad causada por ellas incluyen: *A. barumannii* (neumonía, Bacteremia), *Bordetella pertussis* (tos ferina), *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), *Brucella abortus* (Brucellosis), *Campylobacter jejuni* (Enteritis aguda), *Escherichia coli* (septicemia y neumonía), *Francisella tularensis* (Tularemia), *Haemophilus influenzae* (Gripe), *Helicobacter pylori* (Úlceras pépticas), *Klebsiella pneumoniae* (neumonía), *Legionella pneumophila* (Enfermedad del legionario), *Neisseria gonorrhoeae* (Gonorrea), *Acinetobacteria* sp (Nosocomia; infecciones), *Pseudomonas aeruginosa* (sepsis), *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiosis), *40 Salmonella typhimurium* (Tifoide), *S. dysenteriae* (Disentería), *Vibrio cholerae* (Cólera), *Yersinia pestis* (peste).

Los ejemplos de especies patogénicas gram positivas y de enfermedad causada por ellas incluyen: *Bacillus anthracis* (Antrax), *Clostridium difficile* (Colitis pseudomembranosa), *Corynebacterium diphtheriae* (Difteria), *Enterococcus faecalis* (Infecciones nosocomiales), *Listeria monocytogenes* (Listeriosis), *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberculosis), *Staphylococcus aureus* (Septicemia), *S. pneumoniae* (Neumonía).

45 Las bacterias de los géneros siguientes (incluyendo las especies referidas anteriormente) son particularmente adecuadas para con los presentes métodos: *Escherichia*; *Helicobacter*; *Klebsiella*; *Neisseria*; *Proteobacter*; *Pseudomonas*; *Salmonella*; *Bacillus*; *Clostridium*; *Enterococcus*; *Staphylococcus*; *Shigella*.

50 En un aspecto, la invención se refiere a una célula o células huésped que comprenden un polinucleótido señuelo (molécula señuelo) como se describe en la presente memoria (por ejemplo, introducida en la célula por cualquier método de la presente memoria). En particular, la invención se refiere a dicha célula o células huésped que presentan una expresión génica y/o fenotipo alterado, debido a la presencia del polinucleótido señuelo, por ejemplo, susceptibilidad incrementada a antibiótico o antibióticos, virulencia disminuida, respuesta adaptativa deficiente, comparado con la célula en ausencia del plásmido/molécula señuelo. Por ejemplo, la invención se refiere a patógenos o aislados clínicos que se han convertido en menos viables usando polinucleótidos señuelo como se describe en la presente memoria.

- Los polinucleótidos señalero pueden introducirse en células huésped por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, transformación, transfección, conjugación. Por ejemplo, cuando un polinucleótido comprende un plásmido conjugativo, éste puede introducirse por conjugación. Los polinucleótidos señalero, por ejemplo, estructuras en forma de mancuerna circulares, pueden introducirse en las células por transfección. Las células pueden estar en cultivo líquido y el señalero añadirse al líquido. Alternativamente, las células pueden cultivarse en medio sólido y los señaleros transfecirse de discos de papel absorbente saturados con señalero y utilizados para cubrir el medio. Típicamente, el polinucleótido señalero se añade al medio de cultivo y es captado por las células. Cuando las células se cultivan en medio sólido, los polinucleótidos señalero pueden añadirse a un disco de filtro y ser captados por las células desde el disco. Puede usarse un tampón de permeabilidad para ayudar en la transfección.
- En un aspecto, la transfección de polinucleótidos señalero puede comprender el uso de colesterol. En particular, los métodos pueden usar polinucleótidos señalero lineales, que presentan una modificación de colesterol en uno o ambos extremos 5'. La modificación se cree que facilita la captación por las células.
- Los señaleros pueden marcarse adicionalmente, por ejemplo, en un extremo 5' con un marcador detectable tal como un agente de tinción de fluorescencia, por ejemplo, Cy5. Esto facilitará la monitorización de la captación y mantenimiento en la célula.
- Los señaleros marcados con colesterol y/o detectablemente pueden prepararse usando cebadores marcados con colesterol y/o detectables, como se describe en el Ejemplo 1.
- La transfección del polinucleótido señalero en una célula puede comprender el uso de R9-colesterol, que consiste en una molécula de colesterol unida a una cadena lineal de nueve D-argininas (Kim W.J., et al., Mol. Ther 2006 14: 343-350).
- En general, se monitoriza la captación y/o mantenimiento de los polinucleótidos señalero, o biblioteca de plásmido, en las células. Por ejemplo, un señalero de plásmido puede comprender un marcador detectable, por ejemplo, que codifica resistencia a antibióticos, que permite la selección positiva para la presencia del plásmido y monitorización de la propagación del plásmido. La presencia de un polinucleótido señalero también puede monitorizarse por crt-PCR.
- En general, una secuencia señalero comprende un sitio de unión para un factor de transcripción que compite con sitio de unión de un factor de transcripción celular para unión de un factor de transcripción. Mediante la titulación del factor de transcripción del sitio celular, el señalero altera la expresión del gen o genes unidos operativamente al sitio de unión en la célula.
- Una secuencia señalero puede comprender la secuencia de un sitio de unión celular nativo para un factor de transcripción. Las secuencias nativas están disponibles en la técnica y los ejemplos de secuencias de unión endógenas se presentan en la presente memoria para reguladores específicos.
- Una secuencia señalero puede comprender un sitio de unión consenso para un regulador dado. De nuevo, dichos sitios consenso pueden estar disponibles en la técnica, y se proporcionan ejemplos para algunos reguladores específicos en la presente memoria.
- Alternativamente, una secuencia señalero puede comprender una variante de una secuencia de unión nativa o consenso, que retiene la función señalero.
- Una variante puede prepararse alterando, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nucleótidos en la secuencia parental. Por ejemplo, los experimentos de impronta pueden indicar que nucleótidos particulares son menos cruciales para la unión del factor de transcripción y podrían alterarse.
- Una secuencia señalero potencial puede ensayarse para capacidad de competir con un sitio de unión de un factor de transcripción dado introduciendo un polinucleótido señalero que comprende la secuencia señalero en una célula huésped adecuada. La célula huésped incluye el sitio de unión del factor de transcripción diana unido operativamente a un gen o genes cuya expresión puede determinarse directamente o indirectamente, por ejemplo, cribando para un cambio en fenotipo. La función señalero de una secuencia de ensayo puede determinarse cribando para un cambio en la expresión del gen o genes o un cambio en el fenotipo.
- Puede usarse cualquiera de los polinucleótidos señalero descritos en la presente memoria. Puede usarse cualquiera de las células huésped descritas en la presente memoria.
- Por ejemplo, una secuencia de ensayo puede introducirse en primer lugar en una célula informadora adecuada y monitorizarse la expresión de un gen informador para evaluar la función señalero. Pueden usarse los sistemas de ensayo genéricos basados en informador usando células informadoras "muertas o vivas" descritas en PCT/GB2008/003353. Esta estrategia resuelve el problema de necesitar un fenotipo puntuable ya que en circunstancias normales cada informador causa la muerte celular, es sólo cuando un señalero elimina esto mediante la eliminación del factor de transcripción cuando las células pueden crecer. Por lo tanto, la selección para ambos informadores se basa en la supervivencia celular, lo que acelera en gran medida el proceso de cribado. Otra

característica del sistema es que dichos cribados muerto-o-vivo pueden automatizarse fácilmente como una base de cribados rápidos, exhaustivos o de alto rendimiento. También es posible identificar secuencias reguladoras que controlan promotores que en su contexto natural no tienen un fenotipo fácilmente puntuable.

Alternativamente o adicionalmente, una secuencia señalero puede ensayarse en células huésped que comprenden el sitio de unión diana unido operativamente a su o sus genes afines, de manera que puede determinarse la capacidad para alterar la expresión del gen o genes. Cuando un señalero se pretende para producir un cambio en el fenotipo, la célula huésped usada en el cribado presenta el fenotipo particular.

Por ejemplo, las secuencias señalero para tomar como diana reguladores describas en la presente memoria pueden ensayarse cribando para sensibilidad incrementada de la célula huésped al antibiótico. El antibiótico puede elegirse como se describe en la presente memoria.

En algunos casos, las secuencias señalero pueden ensayarse cribando para otro fenotipo apropiado para el regulador diana. Por ejemplo, los señaleros dirigidos a reguladores de la respuesta al estrés pueden evaluarse detectando una respuesta deficiente al estrés (como se mide por tolerancia a choque fisiológico). Los señaleros dirigidos a reguladores de factores de virulencia pueden evaluarse determinando un programa de virulencia deficiente. Un ejemplo del último podría ser viabilidad baja después de la re-suspensión de un vial congelado o incluso la regulación a la baja de un gen específico (como se mide por cRT-PCR).

Por ejemplo, un señalero FabB dirigido a la regulación de genes esenciales para la síntesis de ácidos grasos puede ensayarse frente a una cepa adecuada, por ejemplo *E. coli* crecida, por ejemplo, en medio LB Luria-Bertani (1% [p/v] Bacto-triptona, 0,5% [p/v] Extracto de levadura, 1% [p/v] NaCl) en presencia de un antibiótico que actúa en el proceso de la síntesis de ácidos grasos, por ejemplo, Cerulenina. Por ejemplo, a concentraciones de Cerulenina de 10 µg/ml, las bacterias no tratadas crecen normalmente y actúan como un comparador para bacterias tratadas con el señalero, que crecen notablemente más lentamente y hasta una densidad final menor.

Por ejemplo, la respuesta al estrés puede inducirse en una cepa adecuada, por ejemplo, *S. aureus* creciendo, por ejemplo, en medio LB en condiciones de estrés, por ejemplo, condiciones alcalinas. Por ejemplo, puede usarse medio LB que contiene KOH, por ejemplo, a 30 mM. Las bacterias no tratadas crecen bien en este medio, debido a la inducción de la respuesta al estrés por las condiciones alcalinas, mientras que las tratadas con el señalero SA_sigB, dirigido a la regulación de sigB que es una parte principal de la respuesta reguladora al estrés, crecen mal.

En algunos casos, el cribado para la expresión del gen o genes relevantes comprende determinar la viabilidad de la célula huésped en condiciones de cultivo adecuadas. Por ejemplo, cuando el fenotipo que se está evaluando es resistencia a antibióticos, el cribado puede comprender cultivar las células en presencia del antibiótico y determinar si las células son viables. En un cribado que comprende las células huésped informadoras "muertas o vivas", el cribado de las células comprende cultivar las células en condiciones en las que la expresión del gen o genes informadores (el gen o genes unidos operativamente a la secuencia reguladora en cis de interés) es determinante para la viabilidad de la célula huésped y aislar las células viables.

Los presentes métodos pueden comprender cultivar las células huésped en medios líquidos, como se describe en la presente memoria, por ejemplo, si el fenotipo celular que se está determinado es la viabilidad celular. Esto puede tener la ventaja de que sólo queda por analizar un pequeño número de células.

Un plásmido n [snare] como se describe en la presente memoria puede prepararse por un método que comprende:

- proporcionar un polinucleótido que comprende una o más copias de una secuencia monomérica; y
- clonar el polinucleótido en un vector plasmídico adecuado.

La composición del monómero es como se describe en la presente memoria para el plásmido n [snare]. Los vectores plasmídicos adecuados también se han descrito.

El polinucleótido que comprende una o más copias de una secuencia monomérica puede proporcionarse por un método que comprende:

- (1) proporcionar un oligonucleótido circular que comprende:
 - (i) una secuencia de interés; y
 - (ii) un sitio de unión para un cebador adecuado para uso en amplificación por círculo rodante;

en el que la secuencia monomérica comprende (i) y (ii); y

 - (2) realizar la amplificación por círculo rodante usando el oligonucleótido circular como molde, proporcionando de esta manera un polinucleótido que comprende repeticiones de la secuencia monomérica.

La etapa (1) del método puede comprender además amplificar los productos de la amplificación por círculo rodante por PCR y aislar los fragmentos de polinucleótido del tamaño requerido, por ejemplo, los fragmentos que comprenden 30-50 repeticiones de la secuencia monomérica. Esto puede hacerse, por ejemplo, por análisis de PAGE.

- 5 Un oligonucleótido circular puede prepararse por un método que comprende:
- proporcionar un oligonucleótido lineal monocatenario que comprende: la secuencia de ensayo de interés (i) y el sitio de unión para un cebador adecuado para uso en la amplificación por círculo rodante (ii);
 - circularizar el oligonucleótido, por ejemplo, usando ligasa Taq, típicamente en presencia de un oligonucleótido de unión universal;
- 10 - opcionalmente digerir el ADN lineal restante con una exonucleasa; y
- recuperar los oligonucleótidos circulares monoméricos, por ejemplo usando PAGE.
- Los cebadores adecuados para uso en la amplificación por círculo rodante se conocen en la técnica. Por ejemplo, puede usarse un cebador T7.
- 15 Los métodos para realizar la amplificación por círculo rodante se conocen en la técnica. Por ejemplo, puede usarse la polimerasa *Bst*I.
- En un ejemplo, la amplificación por PCR de los productos de la amplificación por círculo rodante se realiza usando el mismo cebador que se usó para la amplificación por círculo rodante, por ejemplo el cebador T7.
- En general, la secuencia (i) en el monómero comprende una secuencia snare como se describe en la presente memoria.
- 20 Como se describe en la presente memoria, las secuencias snare pueden aislarse a partir de ADN genómico, por ejemplo a partir de un genoma completo, o de un fragmento genómico. Una secuencia snare, una vez aislada, puede usarse para formar un plásmido n [snare] por el método descrito en la solicitud en tramitación con la presente PCT/GB2008/003353.
- 25 Un protocolo para la preparación de secuencias snare a partir de un genoma o fragmento genómico se describe en PCT/GB2008/003353.
- Como se describe en la presente memoria, una secuencia snare puede comprender una secuencia de nucleótidos aleatorizada. Típicamente, la snare comprende una secuencia de nucleótidos aleatorizada (o variable) con una longitud de "n" nucleótidos. En general, n puede variar de 5-50, por ejemplo 10-50, por ejemplo, 20-40, por ejemplo 25-35, por ejemplo 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 nucleótidos.
- 30 Puede sintetizarse un oligonucleótido que comprende la secuencia aleatorizada (y opcionalmente una secuencia constante como se describe) usando los métodos conocidos en la técnica.
- Puede introducirse un sesgo de nucleótidos en la región aleatorizada (o variable) del oligonucleótido. Por ejemplo, puede introducirse un sesgo GC si es apropiado.
- 35 El monómero en el método anterior puede comprender un oligonucleótido preparado de esta manera. Puede prepararse entonces un plásmido n [snare].
- Como se ha descrito, un aspecto de la invención es incrementar la susceptibilidad de procariotas a antibióticos. Por ejemplo, esto puede implicar tomar como diana un mecanismo intrínseco de resistencia en la célula, o respuestas celulares adaptativas lo que significa que la célula es menos capaz de sobrevivir en condiciones de estrés inducidas por el antibiótico.
- 40 En un aspecto, los presentes métodos son adecuados para incrementar la eficacia de antibióticos generalmente (Alekshun y Levy, Cell (2007) 128: 1037-1050). Esto incluye tanto antibióticos bacteriostáticos como bátericidas. Los ejemplos incluyen la clase de antibióticos conocida como aminoglicósidos (tal como kanamicina); los carbapenemos (tal como meropenem); las cefalosporinas (tal como cefepima); los glicopéptidos (tal como vancomicina y daptomicina); las penicilinas tal como ampicilina, carbenicilina y penicilina; los antibióticos polipeptídicos (tal como polimixcina B); las quinolinas (tal como levaquina); las sulfonamidas (tal como Bactrim); las tetraciclinas (tal como tetraciclina); y de forma diversa, cloranfenicol, rifampicina, Zyvox.

En un aspecto, los métodos que causan la supresión de la respuesta al estrés en una célula, o que causan que la célula se estrese son particularmente adecuados para potenciar los efectos de los antibióticos bactericidas (Kohanski et al, Cell (2007) 130: 797-810).

Los antibióticos bactericidas pueden incluir:

β-lactamas

- (a) Penicilinas
- (b) Carbapenemos
- 5 (c) Monbactamas
- (d) Cefalosporinas

Primera generación: Cefacetrilo (cefacetrilo), Cefadroxil (cefadroxil; Duricef). Cefalexina (cefalexina; Keflex), Cefaloglicina (cefaloglicina), Cefalonio (cefalonio), Cefaloridina (cefaloradina), Cefalotina (cefalotina; Keflin), Cefapirina (cefapirina; Cefadril), Cefatricina , Cefazaflur, Cefazedona, Cefazolina (cefazolina; Ancef, Kefzol), 10 Cefradina (cefradina; Velosef), Cefroxadina, Ceftezol;

Segunda generación: Cefaclor (Ceclor; Distaclor, Keflor, Ranicolor), Cefonicida (Monocida), Cefprozil (cefproxil; Cefzil), Cefuroxima (Zinnat, Zinacef, Ceftina, Biofuroksima), Cefuzonam, Cefmctazol, Cefotetano, Cefoxitina, Carbacefemos: Ioracarbef (Lorabid), Cefamicinas: cefbuperazona, cefmetazol (Zefazona), cefminox, cefotetano (Cefotano), cefoxitina (Mefoxina)

15 Tercera generación: Cefcapeno, Cefdaloxima, Cefdinir (Omnicef), Cefditoren, Cefetamet, Cefixima (Suprax), Cefmenoxima, Cefodizima, Cefotaxima (Claforano), Cefpimizol, Cefpodoxima (Vantina, PECEF), Cefteram, Ceftibuteno (Cedax), Ceftiofur, Ceftioleno, Ceftizoxima (Cefizox), Ceftriaxona (Rocefina), Cefoperazona (Cefobid), Ceftazidima (Fortum, Fortaz), Oxacefemos: latamoxef (moxalactama)

20 Cuarta generación: Cefclidina, Cefepima (Maxipima), Cefluprenam, Cefoselis, Cefozoprano, Cefpiroma, Cefquinoma, Oxacefemos: flomoxef

Todavía por clasificar: Ceftobiprol, Cefaclomezina, Cefaloram, Cefaparol, Cefcanel, Cefedrolor, Cefempidona, Cefetrizol, Cefivitrit, Cefmatiteno, Cefmepidio, Cefovecina, Cefoxazol, Cefrotilo, Cefsumida, Ceftarolina, Ceftíóxido, Cefuracetima

Aminoglicósidos:

- 25 (a) amicacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, rodoestreptomicina, estreptomicina, tobramicina, apramicina;
- (b) Antraciclinas, por ejemplo, doxorrubicina

Quinolonas:

- (a) Fluoroquinolonas;

30 Primera generación;

Segunda generación;

Tercera generación;

Cuarta generación.

Antibióticos glicopeptídicos:

- 35 (a) vancomicina, teicoplanina, telavancina, bleomicina, ramoplanina, decaplanina y dalbavancina.

Antibióticos peptídicos:

- (a) Lantibióticos;

Duramicina, risina, epidermina, actagardina, microbisporicina y mersacidina;

- (b) Lipopéptidos;

40 Cubicina.

Estreptograminas:

Quinupristina + dalfopristina (Synercid®).

5 Sin embargo, los presentes señuelos y métodos también pueden usarse para incrementar la eficacia de antibióticos bacteriostáticos, tales como Macrólidos, Ketólidos, Tetraciclinas, Lincosamidas (por ejemplo, clindamicina), Oxazolidinonas (Linezolid).

Cuando los presentes métodos se usan en terapia, un polinucleótido señuelo puede aplicarse en combinación con uno o más antibióticos, en general antibiótico(s) a los que la célula se vuelve más susceptible por el señuelo. Los antibióticos pueden elegirse de los descritos anteriormente.

10 En algunos casos, es apropiado seleccionar antibiótico(s) para uso según la especie bacteriana y la infección bacteriana que se está tomando como diana.

15 Por ejemplo, *M. tuberculosis* es el agente causante de la tuberculosis que actualmente se trata usando: isoniazid, rifampicina, etanbutol, pirazinimida. Por lo tanto, en un método dirigido a *M. tuberculosis*, podría seleccionarse uno o más de estos fármacos para uso con un polinucleótido señuelo. De manera similar, las infecciones por *S. aureus* se tratan típicamente con penicilinas, las infecciones por Gram-negativas con bacterias que producen β-lactamasas de espectro extenso, por ejemplo, *E. coli* o *K. pneumoniae*, se tratan frecuentemente con β-lactamasas.

20 En algunos casos, el tipo de polinucleótido señuelo y los genes cuya expresión altera en la célula determinarán el tipo de antibiótico(s) para los que la célula se vuelve más sensible (y así el o los antibióticos) que puede usarse en combinación con el señuelo. Por ejemplo, el TFD FabB descrito en la presente memoria, está dirigido a un sitio de unión para un regulador (FadR) de enzimas esenciales requeridas para la síntesis de ácidos grasos. Así, una célula tratada con el señuelo se vuelve más susceptible en particular a antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos grasos. En la presente memoria se proporciona información adicional para dianas específicas.

25 Los presentes señuelos pueden usarse para alterar las respuestas celulares adaptativas o fisiológicas, por ejemplo, cualquiera de las respuestas descritas en la presente memoria. Los señuelos también pueden usarse para alterar la expresión de genes esenciales y por lo tanto alterar la viabilidad de la célula en condiciones en las que el o los genes son esenciales. Los señuelos también pueden usarse para alterar la virulencia de la célula.

Los señuelos también pueden usarse para incrementar la captación del antibiótico, por ejemplo, causando cambios en la composición de la pared o membrana celular.

30 Los señuelos también pueden estar dirigidos a la regulación de sistemas genéticos desconocidos, en particular aquellos señuelos descubiertos por el proceso n [snare] descrito en PCT/GB2008/003353. En estos ejemplos, puede medirse la consecuencia del tratamiento de las bacterias con los señuelos, por ejemplo susceptibilidad al antibiótico, pero el mecanismo genético subyacente a ese cambio de la susceptibilidad permanece desconocido.

En algunos casos, el tratamiento con señuelos dirigidos a la regulación de genes conocidos, tales como WhiB7 y sus homólogos en mycobacteria, incrementa la susceptibilidad de la célula a antibióticos pero el mecanismo fenotípico subyacente a ese cambio permanece desconocido.

35 En algunos casos, los señuelos dirigidos a la regulación de genes implicados en la determinación de la sensibilidad a antibióticos por métodos bioinformáticos, tales como los que se identifican por obtención de perfil transcripcional como implicados en la resistencia a glicopéptido en *S. aureus* y una proporción de los que se ha encontrado que tienen restos reguladores en cis comunes en sus promotores, incrementan la susceptibilidad de la célula a antibióticos pero el mecanismo fenotípico subyacente a ese cambio permanece desconocido.

40 Los presentes polinucleótidos señuelo tienen varias aplicaciones, incluyendo uso terapéutico, por ejemplo, médico o veterinario, y otras aplicaciones ex vivo, por ejemplo, no terapéuticas, por ejemplo, en desinfectantes y productos de limpieza. Los presentes señuelos encuentran uso en métodos en los que existe una necesidad de reducir la viabilidad de células procariotas, matar células, inhibir el crecimiento o reducir la virulencia.

45 Como se ha descrito, los presentes polinucleótidos señuelo y métodos pueden usarse para incrementar la susceptibilidad de procariotas a antibióticos. Así, los señuelos pueden usarse para potenciar los efectos de uno o más antibióticos, tales como los listados en la presente memoria. Esto puede ser para uso médico o veterinario, por ejemplo, para tratar o prevenir una infección bacteriana en los seres humanos o animales, o para uso *in vitro*, por ejemplo, en una composición de limpieza. Así, los señuelos pueden encontrar uso en composiciones bactericidas o bacteriostáticas.

50 Alternativamente, los polinucleótidos señuelo y métodos pueden usarse para proporcionar o incrementar la susceptibilidad de procariotas a factores medioambientales o agentes antibacterianos letales.

Los polinucleótidos señuelo y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para tratar una infección bacteriana en un sujeto que comprende administrar un polinucleótido señuelo descrito en la presente memoria. El

sujeto puede ser un ser humano o animal. Un polinucleótido señuelo descrito en la presente memoria también puede usarse en medicina, por ejemplo, para uso en el tratamiento o prevención de una infección bacteriana en un sujeto, y para la fabricación de un medicamento para tratar una infección bacteriana.

Un señuelo puede usarse en combinación con un antibiótico o antibióticos para los que el señuelo hace a la célula más sensible y/o con otro agente antibacteriano. Los antibióticos adecuados se describen en la presente memoria. El antibiótico puede administrarse simultáneamente con, o antes o después del señuelo. El antibiótico y el señuelo pueden administrarse en la misma composición o en composiciones separadas. Así, la invención incluye terapias de combinación en las que un polinucleótido señuelo, como se identifica y/o como se describe en la presente memoria, se administra a un sujeto en combinación con uno o más antibióticos u otras terapias antibacterianas.

La presente descripción incluye una composición farmacéutica o medicamento que comprende un polinucleótido señuelo y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. La composición puede comprender además uno o más antibióticos u otros anti-bacterianos como se describe.

Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son muy conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co (A.R. Gennaro edit. 1985). La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse respecto a la ruta pretendida de administración y práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además de, el vehículo, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento, agente solubilizante adecuado.

Puede usarse una variedad de métodos para administrar los señuelos de la presente invención al sitio de la infección bacteriana. Los métodos para la administración *in vivo* y/o *in vitro* incluyen, pero no están limitados a, administración bucal u oral, administración intravenosa, inyección directa en la infección o inyección indirecta (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular u otros métodos de inyección), aplicación tópica, exposición directa en disolución acuosa o medio, transfección (por ejemplo, fosfato de calcio, electroporación, basada en DEAE-dextrano y mediada por lípidos), expresión transgénica (por ejemplo, un sistema de expresión de señuelo administrado por microinyección, generación de células madre embrionarias o transferencia retroviral) o cualquiera de los demás sistemas de administración de ácido nucleico usados comúnmente conocidos en la técnica. La administración puede ser en combinación con una dosis adecuada de antibiótico, administrándose el o los antibióticos al mismo tiempo que el señuelo, o separadamente.

Como se describe en los ejemplos más adelante, el número de TFD necesario para mostrar un efecto predecible en la expresión del gen diana y tener un efecto bacteriostático puede ser tan pequeño como cerca de 5.000 moléculas por célula. Se ha mostrado que en los ensayos *in vitro* estandarizados discutidos en los ejemplos tantas como 1.000.000 células bacterianas se matan eficazmente con tan poco como 1 nM de TFD, lo que sugiere que es suficiente tener una eficacia de transfección de menos de 0,001% para conseguir la muerte. La cuantificación de la transfección usando microscopía de fluorescencia para medir la captación de un TFD marcado fluorescentemente demuestra que todas las células de *S. aureus* a la vista están transfectadas. En comparación con otras estrategias basadas en ácido nucleico para abordar infecciones bacterianas, tales como antisentido, este número de moléculas necesarias para matar la célula es 100 a 1.000 veces menor. Esto refleja parcialmente que aunque tanto las estrategias antisentido como TFD actúan para inhibir genes, los TFD actúan en una etapa más temprana para evitar la transcripción mientras que antisentido, en la iteración más común, bloquea estéricamente los productos de la transcripción: muchos miles de moléculas de ARNm. En segundo lugar, los TFD se han diseñado para tomar como diana genes esenciales que se inducen positivamente, de manera que necesitan activarse para la supervivencia, y se regulan positivamente (el factor de transcripción dirige su propia producción). *In vitro*, esta última característica significa que es probable que estén presentes relativamente pocas copias del factor de transcripción cuando el gen no está inducido y de esta manera un pequeño número de TFD puede bloquear la inducción. Puede ser que en una situación terapéutica haya más factores de transcripción por célula, debido a la variedad natural entre la población bacteriana o que el gen ya esté inducido. En esta situación, se espera que se necesitarán más TFD para observar un efecto terapéutico y estimar que el incremento de la dosis por un factor de 100 (hasta 100 nM) o mejorar la eficacia de la transfección (dos órdenes de magnitud) será suficiente para observar un efecto beneficioso.

Algunos señuelos pueden usarse sin antibióticos para tratar o prevenir una infección bacteriana. Por ejemplo, algunos de los señuelos descritos en la presente memoria reducirán la capacidad de la célula para sobrevivir en condiciones de estrés o para expresar genes esenciales u obtener nutrientes esenciales. Algunos señuelos neutralizarán la virulencia celular, por ejemplo, evitando la expresión de factores de virulencia. Así, los señuelos usados para tomar como diana genes esenciales podrían usarse en sí mismos para evitar el crecimiento de bacterias patogénicas particulares, bien como una terapia en sí misma o como una forma de medicina preventiva para abordar las bacterias antes de que se vuelvan infecciones. De manera similar, aquellos señuelos dirigidos a genes determinantes de virulencia podrían usarse en sí mismos para prevenir la diseminación de la infección. En otro ejemplo, los señuelos listados en la presente memoria que actúan frente a *H. pylori* podrían proporcionar terapias independientes frente a úlceras de estómago/desarrollo de cáncer péptico.

De manera similar, los señuelos que actúan para prevenir el crecimiento de *Streptococcus mutans* podrían usarse para tratar o prevenir la decoloración dental.

La infección particular o afección asociada que el señuelo se usa para tratar es en general dependiente de la célula patogénica a la que está dirigido el señuelo. Las infecciones bacterianas y enfermedades asociadas que pueden ser tomadas como diana usando los presentes métodos se listan en la presente memoria en conexión con bacterias particulares y en la Figura 2.

5 Los polinucleótidos señuelo descritos en la presente memoria también pueden usarse *in vitro*, por ejemplo, en productos antibacterianos tales como aquellos para limpiar, por ejemplo, desinfectantes, para matar o prevenir el crecimiento o infectividad de bacterias. Cuando un señuelo incrementa la susceptibilidad a antibióticos, típicamente la composición antibacteriana también incluye uno o más antibióticos y/o uno o más agentes antibacterianos. En un aspecto, la invención se refiere a dicha composición de limpieza.

10 Los polinucleótidos señuelo pueden usarse además en productos que se aplican en una superficie, tal como una mesa de trabajo o manos, durante un tiempo y en condiciones que son suficientes para reducir o prevenir el crecimiento de un microorganismo y/o matar un microorganismo, reduciendo o previniendo de esta manera el crecimiento o matando un microorganismo. Por ejemplo, uno o más señuelos pueden pulverizarse en la superficie. Dicha aplicación por pulverización es útil, por ejemplo, para preparar una superficie para la preparación de un

15 producto alimenticio o esterilizar un objeto que se va a insertar en un paciente. Esto es porque la pulverización de la formulación de señuelo reduce la manipulación de la superficie u objeto, reduciendo de esta manera más el riesgo de contaminación. Las aplicaciones de lavado de manos y boca también se contemplan en el alcance de la invención.

20 En las circunstancias anteriores, los señuelos pueden formularse en un formato acuoso adecuado. En este caso, la formulación puede comprender agua para forma y composición acuosa. La composición acuosa puede comprender además disolventes acuosos y orgánicos y sus combinaciones.

25 También se describen kits para uso antibacteriano que comprenden un polinucleótido señuelo como se describe en la presente memoria y uno o más antibióticos u otro u otros agentes antibacterianos para uso combinado para matar o inhibir el crecimiento o virulencia de bacterias. Típicamente, el kit incluye instrucciones para uso. De nuevo, el kit puede ser para uso terapéutico, por ejemplo, frente a infección bacteriana, o para uso no terapéutico, por ejemplo, para limpieza o desinfección.

La invención se describirá ahora con más detalle mediante ejemplos no limitativos con referencia a las figuras siguientes en las que:

30 **Figura 1.** Una copia de la Tabla 1 de Poole J. (*Antimicrobial Chemother.* (2005) 56, 22-24) que lista la resistencia mediada por eflujo a antibióticos no fluoroquinolina y antibióticos fluoroquinolina, respectivamente. Los números de referencia en la columna de la derecha se refieren a los proporcionados en la publicación.

35 **Figura 2.** Una copia de la Tabla 2 de Poole J. (*supra*) que lista ejemplos de reguladores y secuencias reguladoras que pueden ser diana según los presentes métodos. La Tabla también proporciona ejemplos de cepas bacterianas en las que aparecen los reguladores o secuencias y ejemplos de indicaciones de enfermedad asociadas con estas bacterias.

40 **Figura 3.** Proporciona una representación gráfica de cómo los plásmidos n[snare] pueden usarse para influir en la expresión génica. Un gen (A) es transcripcionalmente inactivo debido a la unión de un factor de transcripción represor (B) a una secuencia reguladora en cis (C) en el promotor del gen. Cuando se introduce en una célula el plásmido n[snare] es capaz de influir en la expresión del gen diana mediante la eliminación del factor de transcripción B del promotor genómico para liberar la represión transcripcional del gen en 3' (D).

Figura 4. Muestra el producto de amplificación obtenido usando los cebadores en SEQ ID NOS: 3 y 4 y un sustrato de vector apropiado (Ejemplo 1,2).

45 **Figura 5.** Muestra curvas de crecimiento para *M. smegmatis* cultivado en presencia de concentraciones sub-inhibidoras de isoniazid (IZ) o rifampicina (RF), en las que las bacterias se han tratado con una secuencia señuelo WhiB7 (+) o se han tratado con una secuencia control negativo (-) como en el Ejemplo 2.

Figura 6. Muestra curvas de crecimiento para *E. coli* crecido en presencia de cerulenina, en las que las bacterias se han tratado con un señuelo FabB (dirigido al sitio de unión FadR) o se han tratado con una secuencia control negativo (-), como en el Ejemplo 3.

50 **Figura 7.** Muestra curvas de crecimiento para *S. aureus* en condiciones de estrés que surgen de electroporación, en las que las bacterias no están tratadas (primera curva) o se han tratado con un señuelo SsaA (segunda curva) o un señuelo LytM (tercera curva) como en el Ejemplo 4.

55 **Figura 8.** Muestra curvas decrecimiento para *S. aureus* crecido en presencia de medio no inoculado (BHI control negativo), transfecido con un TFD control que tiene una secuencia TFD desorganizada y crecido en medio BHI, transfecido con TFD SsaA (que contiene un sitio WalR) y crecido en medio BHI, transfecido con TFD fhu (diseñado para bloquear la captación de hierro) y crecido en medio BHI, transfecido con TFD sig y crecido en

medio BHI, transfectado con un TFD no relacionado y crecido en medio NRPMI (con hierro limitado comparado con BHI) y transfectado con TFD fhm y crecido en medio NRPMI.

Figura 9. Muestra que los TFD Fur no perturban el crecimiento de *S. aureus* en medio en el que el hierro no es limitante. *S. aureus* se creció en medio BHI con el Fur_TFD pero sin Gramicidina como un reactivo de transfección (TFD solo; círculos vacíos) o combinando 60 nM Gramicidina con 1 nM de un TFD control (TFD control; triángulos vacíos) y el Fur_TFD (Fur_TFD; cuadrados llenos) que se diseña para manipular la expresión del operón *fhu*. Los resultados son la media de tres repeticiones y las barras de error muestran el error estándar.

Figura 10. Muestra que Fur_TFD elimina la represión de los genes *fhu*. (A). Transfección mediada por gramicidina de *S. aureus*. Las células se trataron con TFD solo, o Gramicidina y bien el Control o Fur_TFD se recogieron, se lavaron y se lisaron. Se usó cPCR para establecer los números medios de TFD respecto al número de genomas. (B). La transfección de Fur_TFD reprime los genes fur en *S. aureus*. Se usaron muestras paralelas para determinar los niveles relativos de expresión de *fhu* por cPCR.

Figura 11. Muestra que Fur_TFD previene el crecimiento de *S. aureus* en medios con hierro limitado. *S. aureus* se creció en un medio con hierro limitado, NRPMI, con el Fur_TFD pero sin la Gramicidina como un reactivo de transfección (TFD solo; círculos vacíos) o combinando 60 nM Gramicidina con 1 nM de un TFD control (TFD control; triángulos vacíos) y el Fur_TFD (Fur_TFD; cuadrados llenos). Los resultados son la media de tres repeticiones y las barras de error muestran el error estándar.

Figura 12. Muestra los resultados de análisis genético para determinar el rango de huésped eficaz potencial del TFD dirigido a Fur de *S. aureus* (SAfhu). La secuencia consenso derivada MEME mostrada en el panel superior de la figura es un resto de sitio de unión Fur de *S. aureus* creado a partir de las secuencias listadas en el panel inferior.

Figura 13. Muestra curvas de crecimiento de tres cepas MRSA bien en presencia de un TFD control o un TFD (TFD SA3) que contiene las secuencias de reconocimiento -10/-35 para el factor Sigma alternativo SigB de *S. aureus*.

Figura 14. Muestra que los TFD Sig en una configuración "en mancuerna" reprimen el crecimiento de la cepa MRSA clínicamente aislada MRSA-5.

Figura 15. Muestra que TFD WalR en la configuración en mancuerna previene el crecimiento de EMRSA15. El TFD fhu se usa como un control.

Figura 16. Muestra *S. aureus* crecido en medio BHI con mezcla 1 nM WalR_TFD/DOTAP pero sin Lisostafina como un reactivo de transfección (TFD solo; círculos vacíos) o combinando 62 µg/ml Gramicidina con 1 nM de un TFD control (Scr_TFD; triángulos vacíos) y el WalR_TFD (cuadrados llenos) que se diseña para manipular la expresión del regulón WalKR.

Figura 17. No se ha detectado mecanismo de resistencia. (A) Cuentas viables totales de EMRSA-16 después de la finalización de experimentos de crecimiento *in vitro* descritos en la Figura 1. (B) Las células que no fueron matadas por el tratamiento con WalR_TFD se sub-cultivaron y ensayaron en experimentos de crecimiento *in vitro*. WalR_TFD mató eficazmente las células sub-cultivadas. Se realizaron cinco rondas posteriores y no se observó re-crecimiento para aquellas células tratadas con WalR_TFD como se determina midiendo las cuentas viables totales. (C) De manera similar, las curvas de crecimiento de bacterias que habían sido expuestas previamente a cuatro rondas de selección con TFD no mostraron signos de resistencia ya que fueron matadas eficazmente. El crecimiento celular se midió registrando A420 de los cultivos durante un periodo de 30 h, las células no se trataron (medio solo; círculos abiertos), se trataron con el TFD control más mezcla de transfección (triángulos abiertos) o el WalR_TFD más mezcla de transfección (cuadrados llenos).

Figura 18. Experimentos de microdilución demuestran que sólo se necesita un contacto limitado para que WalR_TFD mate a EMRSA-16. Las células no se trataron (medio solo; círculos abiertos), se trataron con el TFD control más mezcla de transfección (triángulos abiertos) o el WalR_TFD más mezcla de transfección (cuadrados llenos) por incubación durante 30 minutos antes de ser diluidas 100 veces en medio sin agentes de transfección ni complejos de TFD. Sólo aquellas células tratadas originalmente con WalR_TFD fueron incapaces de crecer.

Figura 19. WalR_TFD es tan eficaz como vancomicina para matar EMRSA-16 en un modelo de sepsis en ratón. Se midió la carga renal de EMRSA-16 después de la infección sistémica de ratones y tratamiento con el TFD control (Scr_TFD, 1 nM WalR_TFD, vancomicina y vehículo solo).

Figura 20. Muestra que la transfección de *E. coli* con TFD FabB sensibiliza a las bacterias a antibióticos (cerulenina) que inhiben la síntesis de ácidos grasos. TFD WhiB7 se usa como un control negativo ya que es un FD que porta una secuencia que no aparece en el genoma de *E. coli*.

Figura 21. Muestra que la transfección de un TFD que contiene la secuencia de reconocimiento para el factor σ54 de *Klebsiella pneumoniae* retarda el crecimiento bacteriano. TFD WhiB7 se usa como un control negativo.

Figura 22. Muestra secuencias identificadas como sitios de unión WalR para encontrar concordancias cercanas en *S. aureus* y otros organismos. Se muestra un subconjunto de aciertos a partir de los cuales se ha derivado una secuencia consenso.

Figura 23. El panel A muestra una secuencia consenso derivada de MEME para el sitio de unión SigB de *S. aureus*.
5 El panel B lista ejemplos de ocurrencias (con valores E < 100) de concordancias a una secuencia consenso en Bacillales (infecciones Gram-positivas para las que los géneros representativos incluyen *Bacillus*, *Listeria* y *Staphylococcus*).

Figura 24. El panel A muestra que TFD KP_Sig mata a *K. pneumoniae* *in vitro*. El TFD que contiene la secuencia KP_Sig previno el crecimiento celular *in vitro* (KP_Sig, cuadrado lleno). Se usaron dos controles: células no tratadas (*K. pneumoniae*, círculo vacío) y un TFD control que consiste en una secuencia desorganizada (TFD control KP, triángulo vacío). El panel B muestra una secuencia consenso derivada de MEME para el sitio de unión Sig de *K. pneumoniae*.

Descripción breve de las secuencias

SEQ ID NOS: 1 y 2 - cebadores oligonucleotídicos usados para la amplificación de una secuencia diana del vector pGEMT-Easy como en el Ejemplo 1.1.

SEQ ID NOS: 3 y 4 - cebadores oligonucleotídicos usados para la amplificación de una secuencia diana del vector pGEMT-Easy en la producción de señuelos en mancuerna como en el Ejemplo 1.2.

SEQ ID NO: 5 - el señuelo WhiB7 usado en el Ejemplo 2

SEQ ID NO: 6 - el señuelo FabB usado en el Ejemplo 3

20 SEQ ID NO: 7 - el señuelo LytM usado en el Ejemplo 4

SEQ ID NO: 8 - el señuelo SsaA usado en el Ejemplo 4

SEQ ID NO: 9 - un sitio de unión nativo WhiB7 en *M. smegmatis* cepa MC2 155

SEQ ID NO: 10 - un sitio de unión nativo FadR en *E. coli* K12

SEQ ID NO: 11 - un sitio de unión nativo para YycF/YycG en *S. aureus*

25 SEQ ID NO: 12 - un sitio de unión nativo para YycF/YycG en *S. aureus*

SEQ ID NO: 13 - un sitio de unión nativo para Sig^B en *S. aureus*

SEQ ID NO: 14 - un sitio de unión nativo para Sig^B en *K. pneumoniae*

SEQ ID NO: 15 - una secuencia consenso para la unión de Fur en *S. aureus*

SEQ ID NO: 16 - una secuencia consenso para la unión de Fur en *E. coli*

30 SEQ ID NO: 17 - una secuencia de unión nativa para Fur en *H. pylori*

SEQ ID NO: 18 - un sitio de unión consenso para TcdR en *C. difficile*

SEQ ID NO: 19 - un sitio de unión consenso para Vfr en *P. aeruginosa*

SEQ ID NO: 20 - un sitio de unión nativo para Vfr en *P. aeruginosa*

SEQ ID NO: 21 - un sitio de unión nativo para Vfr en *P. aeruginosa*

35 SEQ ID NO: 22 - un sitio de unión nativo para NtrC en *K. pneumoniae*

SEQ ID NO: 23 - una secuencia de unión nativa para ArsR en *H. pylori*

SEQ ID NO: 24 - una secuencia de unión nativa para ArsR en *H. pylori*

SEQ ID NO: 25 - una secuencia consenso resistente a glicopéptido en *S. aureus*

SEQ ID NO: 26 - un resto de unión Agr en *S. aureus*

40 SEQ ID NO: 27 - un resto de unión Agr en *S. aureus*

SEQ ID NO: 28 - secuencia de cebador directo para la preparación por PCR del TFD SasigB

- SEQ ID NO: 29 - secuencia de cebador inverso para la preparación por PCR del TFD SasigB
SEQ ID NO: 30 - secuencia de cebador directo para la preparación por PCR del TFD SAfhu
SEQ ID NO: 31 - secuencia de cebador inverso para la preparación por PCR del TFD SAfhu
SEQ ID NO: 32 - secuencia de cebador directo para la preparación por PCR del TFD SsaA
5 SEQ ID NO: 33 - secuencia de cebador inverso para la preparación por PCR del TFD SsaA
SEQ ID NO: 34 - secuencia control
SEQ ID NO: 35 - secuencia control
SEQ ID NO: 36 - secuencia de cebador directo para la amplificación por PCR de ARNr 16s
SEQ ID NO: 37 - secuencia de cebador inverso para la amplificación por PCR de ARNr 16s
10 SEQ ID NO: 38 - secuencia de cebador directo para la cuantificación por PCR del gen fhu
SEQ ID NO: 39 - secuencia de cebador inverso para la cuantificación por PCR del gen fhu
SEQ ID NO: 40 - secuencia oligonucleotídica del TFD Sig en mancuerna fosforilada
SEQ ID NO: 41 - secuencia oligonucleotídica del TFD Sig en mancuerna fosforilada
15 SEQ ID NO: 42 - cebador fosforilado para TFD en mancuerna que contiene la versión desorganizada del sitio de unión Sig
SEQ ID NO: 43 - cebador fosforilado para TFD en mancuerna que contiene la versión desorganizada del sitio de unión Sig
SEQ ID NO: 44 - oligonucleótido en mancuerna fosforilado que incorpora la secuencia de unión para WalR
SEQ ID NO: 45 - oligonucleótido en mancuerna fosforilado que incorpora la secuencia de unión para WalR
20 SEQ ID NO: 46 - oligonucleótido en mancuerna fosforilado que incorpora una versión desorganizada del sitio de unión de WalR
SEQ ID NO: 47 - oligonucleótido en mancuerna fosforilado que incorpora una versión desorganizada del sitio de unión de WalR
SEQ ID NO: 48 - oligonucleótido fosforilado que incorpora el sitio de unión para WalR
25 SEQ ID NO: 49 - oligonucleótido fosforilado que incorpora el sitio de unión para WalR
SEQ ID NO: 50 - cebador directo para el promotor FabB
SEQ ID NO: 51 - cebador inverso para el promotor FabB
SEQ ID NO: 52 - cebador directo para TFD WhiB7
SEQ ID NO: 53 - cebador inverso para TFD WhiB7
30 SEQ ID NO: 54 - cebador directo para TFD que contiene la secuencia de reconocimiento para el factor σ54 de *K. pneumoniae*
SEQ ID NO: 55 - cebador inverso para TFD que contiene la secuencia de reconocimiento para el factor σ54 de *K. pneumoniae*
SEQ ID NO: 56 - secuencia de un péptido que penetra en células
35 SEQ ID NO: 57 - secuencia consenso de TFD WalR
SEQ ID NO: 58 - secuencia consenso de TFD SigB
SEQ ID NO: 59 - secuencia de TFD KP_Sig
SEQ ID NO: 60 - secuencia consenso de TFD KP_Sig

EJEMPLOS

Aunque en general muchas de las técnicas mencionadas en la presente memoria son muy conocidas en la técnica, puede hacerse referencia en particular a Sambrook y Russell, 3^a Edición 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual.

5 **Ejemplo 1****1.1 TFD marcados con colesterol en presencia de Estreptolisina-O**

Usando cebadores oligonucleotídicos, uno de los cuales tiene una modificación 5' con colesterol y el otro una modificación similar en su extremo 5' o alguna otra (tal como un agente de tinción fluorescente, tal como Cy5, de manera que la captación del señuelo del factor de transcripción (TFD) puede medirse fácilmente) se prepara un TFD por PCR. Si el TFD se ha clonado previamente en un vector (pGEMT-Easy) los cebadores se diseñan para hibridar con las secuencias del vector que flanquean inmediatamente el inserto, por ejemplo:

**SEQ ID NO: 1 Chol_TEf: 5' Colesterol -TEG-GGC CGC CAT GGC GGC CGC GGG
AAT TC**

SEQ ID NO: 2 Cy5_TER: 5' Cy5- AGG CGG CCG CGA ATT CAC TAG TG.

Si la secuencia que se va a usar para un TFD no se ha clonado puede sintetizarse directamente (si es lo suficientemente corta) e hibridarse para formar el TFD o amplificarse directamente a partir del ADN genómico 15 usando cebadores diseñados para hibridar en el TFD.

El producto de PCR se precipita con etanol y se resuspende en tampón TE (10 mM Tris.HCl, 1 mM EDTA pH 8,0) a una concentración de 500-1.000 ng/μl. Típicamente, los ensayos de sensibilidad a antibiótico se realizan usando placas de 96 pocillos, conteniendo cada pocillo 200 μl de caldo. Por ejemplo, en el caso de *Enterococcus faecium* este caldo es medio BHI (Infusión Cerebro Corazón) (Becton Dickinson) suplementado con 0,2 U/ml de Estreptolisina-O (Sigma) y 5 μg/ml de antibiótico vancomicina y se inocula con una cepa resistente a vancomicina de *E. faecium*.

1.2 Preparación de Estructuras en Forma de Mancuema por PCR

Los señuelos en forma de mancuerna son ADN monocatenario cerrado covalentemente caracterizados por un centro bicatenario, que contiene el sitio de unión para el factor diana, flanqueado por estructuras en horquilla. Las horquillas estabilizan el señuelo evitando la acción de exonucleasas que de otra manera degradarían el polinucleótido señuelo. Por lo tanto, los señuelos en forma de mancuerna (DB) se llaman así por su forma característica.

Los DB se preparan por PCR usando como molde un plásmido derivado de pGEMTEeasy que contiene el sitio de unión diana, como se describe en la sección 1.1. Los cebadores usados en la amplificación son:

**SEQ ID NO: 3 DBTEf: 5' P- CTTGG TTTT CCAAG AGAAGAGC CCG CCA TGG
CGG CCG CGG GAA TTC**

**SEQ ID NO: 4 DBTER: P- CCG TCT TTT TGA CGG CGA AGA GCA GGC GGC CGC
GAA TTC ACT AGT GA**

30 La parte de los cebadores que formará las horquillas está subrayada. La amplificación con el vector apropiado proporciona el producto de ADN mostrado en la Figura 4, en el que la parte del DB que se unirá al factor de transcripción se proporciona por "NNN NNN". Las secuencias mostradas en negrita representan un sitio de unión para la enzima de restricción de mellado *Nt.BspQ1*. En la segunda parte de la Figura 4, se muestra la consecuencia de digerir el producto de PCR con *Nt.BspQ1*; esto expone las estructuras en horquilla como regiones monocatenarias que formarán una horquilla y pueden ligarse posteriormente por tratamiento con ADN ligasa T4 para formar un círculo cerrado covalentemente y DB.

1.3 Preparación de oligonucleótidos en forma de mancuerna por digestión por restricción del plásmido

Alternativamente, pueden prepararse estructuras en forma de mancuerna clonando el producto de PCR romo mostrado en la Figura 4 en un vector de clonación de PCR adecuado, lo que confirma su identidad y preparación del 40 plásmido. El plásmido puede digerirse para liberar el inserto que se digiere adicionalmente con *Nt.BspQ1* para

liberar el fragmento mostrado en la segunda parte de la Figura 4. Éste puede tratarse de manera similar con ADN ligasa T4 con el fin de cerrar covalentemente la molécula de ADN y formar un DB.

La ventaja de esta estrategia es que es más factible, tanto prácticamente como económicamente, para aumentar de escala si la estructura en forma de mancuerna se requiere en grandes cantidades.

5 *1.4 Transfección con el agente R9-colesterol.*

El R9-colesterol se ha descrito por sus propiedades de ayudar en la transfección de moléculas de siARN (u otra terapia basada en ácido nucleico) y semejantes en células eucariotas (Solicitud de Patente US No. 2007-0207966). Aquí describimos su utilidad para transfectar varias bacterias con TFD.

10 El R9-colesterol, que consiste en una molécula de colesterol unida a una cadena lineal de nueve D-argininas, se sintetizó como se ha descrito previamente (Kim W.J. et al., Mol. Ther (2006) 14: 343-350). Los TFD se mezclaron con cantidades crecientes de R9-colesterol en un tampón basado en TE suplementado con 5% glucosa. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y se usó directamente en transfecciones o se analizó por electroforesis en gel de agarosa. Típicamente, se usó la cantidad mínima de R9-colesterol que causaba que el complejo con ADN no corriera en el gel; es decir, la carga del núcleo de ácido nucleico se había neutralizado por la unión de poli-arginina. La molécula de colesterol ayuda a que el TFD se asocie con la membrana bacteriana y de esta manera entre en la célula.

15 Los conjugados TFD/R9-colesterol se mezclaron a varias concentraciones en 200 µl de cultivo en una placa de 96 pocillos. Por ejemplo, en el caso de *Enterococcus faecium* este caldo es medio BHI (Becton Dickinson) suplementado con 0,2 U/ml de Estreptolisina-O (Sigma) y 5 µg/ml de antibiótico vancomicina y se inoculó con una cepa resistente a vancomicina de *E. faecium*.

Ejemplo 2

Señuelo WhiB7 para sensibilizar *Mycobacterium smegmatis* a antibióticos

20 WhiB7 es un gen en *Mycobacterium smegmatis* que se ha mostrado que tiene un papel en la determinación de la sensibilidad de esta bacteria a antibióticos. La delección funcional de este gen convierte a la bacteria en hipersensible a antibióticos (PNAS (2005) 102: 12200). Se cree que WhiB7 es un regulador transcripcional y varios de dichos genes se han descrito en la bibliografía. Un homólogo cercano de WhiB7 existe en el patógeno *Mycobacterium tuberculosis* que es el agente causante de la Tuberculosis.

25 Se preparó un oligonucleótido señuelo que contiene la secuencia señuelo WhiB7 como se describe en el Ejemplo 1.1 y se usaron varias concentraciones para transfectar *M. smegmatis* crecido en 20 ml de caldo (en matraces con agitación de 200 ml que contienen un deflector metálico). El medio usado fue 9H11 (Becton Dickinson) suplementado con 10% ODAC (Becton Dickinson) y concentraciones sub-inhibidoras de los antibióticos isoniazid (IZ) o rifampicina (RF). Los matraces se incubaron a 37°C con agitación y a varios intervalos se tomaron muestras y se midieron sus absorbancias (para monitorizar el crecimiento celular). Los matraces se trataron con 100 nM del TFD WhiB7 (+) o se trataron con el TFD control negativo (-). Fue evidente que en los matraces tratados con el TFD WhiB7, pero no con el TFD control, las células se volvieron sensibles a los dos antibióticos ensayados (véase la Figura 5).

SEQ ID NO: 5 - WhiB7 TFD 5' TGG CCA CGG ATC CGG GTG ACT GCG GGT CCG

TGG CCT 3'

Ejemplo 3

Señuelo FabB para regular a la baja genes esenciales de *Escherichia coli*

40 El señuelo FabB contiene el sitio de unión para el regulador FadR que controla la expresión de genes implicados en la ruta esencial de la síntesis de ácidos grasos (incluyendo *fabA* y *fabB*). Se ha demostrado que la inactivación funcional del gen *fadR* resulta en *Escherichia coli* resulta en una cepa que es deficiente en aspectos de la síntesis de ácidos grasos y es incapaz de crecer en presencia del antibiótico cerulenina (que está dirigido a la síntesis de ácidos grasos (J. Bacteriol. (2005) 183: 5292))

45 El señuelo FabB contenía la secuencia:

**SEQ ID NO: 6 FabB TFD 5' TTT ATT CCG AAC TGA TCG GAC TTG TTC AGC GTA
CAC GTG TTA GCT ATC CTG CGT GCT TCA 3'**

El señuelo se preparó como se describe en el Ejemplo 1.1 y se usó a varias concentraciones para transfectar un pocillo de una placa de 96 pocillos que contenía 200 µl de medio Rico (10 g Triptona, 5 g NaCl, 1 g Extracto de

levadura por litro y suplementado con 0,2% glucosa y 0,4% acetato, concentraciones finales) suplementado con 1 µg/ml cerulenina (Sigma). Las placas se incubaron a 37°C con agitación y se tomaron lecturas de absorbancia (a 595 nm) usando un lector de placas. Todos los puntos de datos se realizaron en triplicado. Las bacterias bien no se trataron con los TFD (No tratadas), se transfecaron con TFD FabB (FabB) o un control negativo que consistió en un TFD cuya secuencia no aparecía en el genoma de *E. coli* (Van).

Como es evidente en la Figura 6, la muestra no tratada y el control negativo crecieron ambos a velocidades comparables en el caldo pero el tratamiento con el TFD FabB causó que las células no crecieran apenas.

Ejemplo 4

Señuelos para sensibilizar *Staphylococcus aureus* a respuesta al estrés

10 Se transfecaron polinucleótidos señuelo en *S. aureus* por electroporación. Las células bacterianas se prepararon por métodos estándar. Brevemente, las células se crecieron hasta la fase exponencial temprana en medio LB a 37°C como se define al alcanzar una Absorbancia de 0,3 a 420 nM. Las células se enfriaron hasta 4°C y se recogieron por centrifugación a velocidad baja y se lavaron tres veces en un volumen similar de glicerol 10% (v/v) estéril, enfriado en hielo. Finalmente, las células se resuspendieron en un décimo de su volumen original en 10% glicerol. La 15 electroporación se realizó mezclando 50 µl de células con 1 µl de TFD (típicamente 100 ng a 1 µg de ADN) en una cubeta de electroporación y se electroporaron en un Genepulser de BioRad con ajustes de 2,5 kEV, 100 Ω y 25 µF, proporcionando constantes de tiempo en el intervalo 3,8 a 4,8 ms. Típicamente, se usaron 50 µl de células electroporadas para inocular 10 ml de medio BHI o LB con 30 mM KOH (para inducir respuesta al estrés). Se 20 alicuotaron 200 µl de células en pocillos de una placa de 96 pocillos que se incubó a 37°C con agitación moderada, el crecimiento se monitorizó midiendo la absorbancia. Las representaciones de las curvas de crecimiento demostraron los efectos de TFD específicos en ralentizar la velocidad de crecimiento comparado con un control que se había obtenido mediante una electroporación simulada (en la que no se había transfecido ADN) o transfecido con una secuencia no relacionada (Figura 7). Las secuencias señuelo siguientes fueron capaces de ralentizar el crecimiento de *S. aureus* en condiciones de estrés:

**SEQ ID NO: 7: LytM TFD 5' GCT ATT TTG TAA TGA CAA TGT AAT GAG TTT
AGT AAA AA 3'**

25 **SEQ ID NO: 8 SsaA TFD 5' ATT ACA AAT TTG TAA CAG ACT TAT TTT A 3'.**

Ejemplo 5

El TFD Sig inhibió el crecimiento de *S. aureus*

30 Sig_TFD contenía el sitio de unión para la proteína SigB de *S. aureus*. Esta proteína es el factor sigma alternativo que controla un gran conjunto de genes relacionados con el estrés (Wigneshwarajaj, Molecular Microbiology (2008) 68: 538). Mediante la transfección de células de *S. aureus* con este TFD y crecimiento de las células en placas de 96 pocillos en medio definido, es evidente que el TFD inhibe el crecimiento de las células. El ADN de Fhu contiene el 35 sitio de unión para el factor de transcripción Fur que regula la captación de hierro en condiciones en las que este ión es limitante (Horsburgh et al, J. Bacteriol. (2001) 183: 468). SsA contiene el sitio de unión para el regulador con dos componentes WalR, que se ha mostrado previamente que regula 12 genes que influyen en la velocidad de crecimiento (Dubrac y Msadek, J. Bacteriology (2004) 186: 1175).

5.1 Preparación de TFD por PCR

Los TFD se preparan por PCR como se describe en la solicitud en tramitación con la presente PCT/GB2008/003353. Los cebadores oligonucleotídicos usados en la reacción de PCR modificados típicamente en el extremo 5', por ejemplo, uno de los cuales tiene una modificación 5' colesterol. Otras modificaciones usadas incluyen biotina, 40 aminas, péptidos que penetran en células, marcador fluorescente, tal como Cy5 o fluoresceína, de manera que la captación del TFD puede medirse fácilmente. Otras modificaciones consideradas para ensayar incluyen lípidos que son característicos de las membranas de bacterias patogénicas. Los TFD generados por PCR pueden modificarse por lo tanto en sus extremos 5' con una variedad de moléculas que sirven para: incrementar la estabilidad *in vivo* del TFD; incrementar la eficiencia de la captación; permitir la detección por fluorescencia. Si el TFD se ha clonado 45 previamente en un vector (pGEMT-Easy), los cebadores se diseñan para hibridar con las secuencias del vector que flanquean inmediatamente el inserto, por ejemplo:

**SEQ ID NO: 1 - Chol_TEf: 5' Colesterol -TEG-GGC CGC CAT GGC GGC CGC GGG
AAT TC 3'**

SEQ ID NO: 2- Cy5_TER: 5' Cy5- AGG CGG CCG CGA ATT CAC TAG TG 3'.

El producto de PCR se precipita con etanol y se resuspende en tampón TE a una concentración de 500-1.000 ng/ μ l

5 Los TFD se clonian hibridando entre sí parejas de oligonucleótidos fosforilados sintéticos que contienen el sitio de unión que se va a ensayar. Cada pareja de oligonucleótidos contiene una adenina en el extremo 3', esto es para facilitar la clonación en el vector pGEM_Teasy que tiene protuberancias de timina en 5' (para acelerar la clonación de los productos de PCR).

Las secuencias de cebador que se usaron para el TFD Sig son:

SEQ ID NO: 28 – SasigB DIR: GAA GAT TAG AAA TTA TTT CGA T GGG TAT ATA ATA A

SEQ ID NO: 29 – SASigB INV: TAT TAT ATA CCC ATC GAA ATA ATT TCT AAT CTT C A

Las secuencias de cebador que se usaron para el TFD Fhu son:

SEQ ID NO: 30 – SAfhu DIR: ACT ACA AGT ACT ATT AGT AAT AGT TAA CCC TA

SEQ ID NO: 31 – SAfhu INV: AGG GTT AAC TAT TAC TAA TAG TAC TTG TAG TA

10 Las secuencias de cebador que se usaron para el TFD SsaA son:

**SEQ ID NO: 32 - SsaA DIR: ATT ACA AAT TTG TAA CAG ACT TAT TTT A
SEQ ID NO: 33 - SsaA INV: AAA ATA AGT CTG TTA CAA ATT TGT AAT A**

5.2 Realización de estudios de crecimiento en placas de 96 pocillos

15 Se prepararon polinucleótidos señuelo marcados con colesterol/Cy5 como en la sección 5.1. Típicamente, se formó un complejo con 1 μ g de TFD y 0,3 μ l del reactivo de transfección liposomal DOTAP (Roche) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Los ensayos para determinar su efecto en el crecimiento de células bacterianas se realizaron usando placas de 96 pocillos, contenido cada pocillo 200 μ l de caldo que consistía en medio BHI (de Becton Dickinson), que no está limitado en hierro, suplementado con 60 nM Gramicidina (de Sigma Corporation. Cat# G5002) o medio desprovisto de hierro (NRPMI) suplementado de manera similar con Gramicidina. El método para la depleción del hierro se describe completamente en otro lugar (Science (2004) 305: 1626-1628).
20 Se añadió 1 μ l de varias concentraciones de un señuelo marcado con Colesterol/Cy5 formando un complejo con TFD a cada pocillo y su efecto en el crecimiento bacteriano de *S. aureus* se monitorizó midiendo la absorbancia del caldo a intervalos durante la incubación. Las placas se incubaron a 37°C con agitación y se tomaron lecturas de absorbancia (a 450 nM) usando un lector de placas. Se ensayaron varios señuelos: Sig, fhu y SsaA.

25 Como se puede observar en la Figura 8, es evidente que el tratamiento con tan poco como 10 nM de TFD Sig previno el crecimiento en medio BHI, mientras que una cantidad similar del TFD fhu no tuvo efecto en el crecimiento bacteriano en este medio, que no es limitado en hierro. 10 nM del TFD SsaA resultaron en un retraso mensurable en el crecimiento bacteriano.

30 Cuando se usó un medio con hierro limitado, 10 nM del TFD fhu se mostró capaz de prevenir el crecimiento, mientras que una cantidad similar de un TFD control (SsaA) no tuvo efecto en el crecimiento bacteriano en estas condiciones

Ejemplo 6

Los TFD Fur controlan la expresión de fhu y previenen el crecimiento de *S. aureus* en medios con hierro limitado

35 Se diseñaron TFD para unirse al factor de transcripción Fur, que juega un papel central en el control de la captación de hierro bacteriana (Somerville y Proctor (2009) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73: 233-248), regulando negativamente el operón *fhu* que controla la entrada de hierro secuestrado. El hierro es esencial para el crecimiento - se necesita para la transferencia de electrones y actúa como un cofactor en muchos procesos enzimáticos. Sin embargo, en el huésped, el hierro está presente en cantidades limitadas y habitualmente se vuelve inaccesible a las bacterias por la

incorporación en proteínas vehiculares del huésped tales como transferrina y lactoferrina. En respuesta a esto, *S. aureus* sintetiza quelantes de hierro de alta afinidad, sideróforos, que unen hierro y usan transportadores ABC, tales como el codificado por *fhuCBG*, para importar el complejo hierro-sideróforo en el citoplasma bacteriano. Como la importación de hierro en exceso resultaría en la formación de radicales libres por la reacción de Fenton, con daño celular posterior (Wandersman y Delepelaire, Ann Rev Microbiol (2004) 58: 611-647), la captación de hierro debe estar muy regulada. Las cepas con inactivación de Fur crecen poco en medios con hierro limitado *in vitro* y pierden su patogenicidad en modelos animales (Horsburgh, et al. J. Bacteriol (2001) 183: 468-475), lo que demuestra el potencial de Fur como una diana terapéutica.

6.1 MÉTODOS

10 6.1.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se crecieron cultivos de *S. aureus* ATCC 6538NA y se mantuvieron en medio BHI (Becton Dickinson). Se prepararon preparaciones madre congeladas mezclando volúmenes iguales de un cultivo en crecimiento exponencial temprano (DO de 0,3 a A₆₀₀) con 50% glicerol y congelando a -80°C. BHI fue el medio usado para condiciones no limitantes de hierro y NRPMI, que se había preparado como se ha descrito previamente (Skaar et al. 2004), para condiciones de crecimiento limitantes de hierro.

15 6.1.2 Preparación de TFD

Los plásmidos que contienen las secuencias TFD se crearon hibridando oligonucleótidos que contienen el sitio de unión para Fur (SAFur1, 5' P-ACT ACA AGT ACT ATT AGT AAT AGT TAA CCC TA-3' (**SEQ ID NO: 30**) y SAFur2, 5' P-AGG GTT AAC TAT TAC TAA TAG TAC TTG TAG TA-3' (**SEQ ID NO: 31**)) y una secuencia control (Con1, 5' P-TGG CCA CGG ATC CGG GTG ACT GCG GGT CCG TA-3' (**SEQ ID NO: 34**) y Con2, 5' P-ACG GAC CCG CAG TCA CCC GGA TCC GTG GCC AA-3' (**SEQ ID NO: 35**)), ligándolos en el vector pGEMTEasy (Promega) y transformándolos en *E. coli* DH5α (Invitrogen). Los TFD se amplificaron por PCR usando cebadores marcados dirigidos pGEMTeasy col-Tef (5'-Colesterol-GGC CGC CAT GGC GGC CGC GGG AAT TC-3' (**SEQ ID NO: 1**)) y cy5-Ter (5'-Cy5-AGG CGG CCG CGA ATT CAC TAG TGA-3' (**SEQ ID NO: 2**)) y se purificaron por precipitación con etanol.

20 6.1.3 Procedimiento de transfección

Una disolución madre de gramicidina (Sigma) se preparó fresca disolviendo 21 mg en 1 ml de metanol, diluido antes de uso en agua y diluyendo además 1/100 en medio de crecimiento para proporcionar una concentración final de 60 nM. El medio suplementado se inoculó 1/100 con la preparación madre congelada de *S. aureus* y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se formaron complejos TFD-DOTAP mezclando 1 µg de TFD con 2 µg de DOTAP (Roche) e incubando a temperatura ambiente durante 10 min en la mesa de trabajo. El complejo TFD se mezcló con medio inoculado, se alicuotó en placas de 96 pocillos de fondo redondo y el crecimiento se analizó cultivando a 37°C con agitación en un lector de placas BioTek.

25 6.1.4 Cuantificación del número de TFD por cPCR en tiempo real

30 Las células de pocillos individuales se lavaron dos veces en PBS (disolución salina tamponada con fosfato) y se resuspendieron en 100 µl de agua. Se usó 1 µl de cada muestra en cada reacción de cPCR, mezclando los estándares de ADN o muestras con cebadores para amplificar el TFD (Tef y Ter; **SEQ ID NOs 1 y 2**) o ARNr 16S (stypF, 5'-ACG GTC TTG CTG TCA CTT ATA-3' (**SEQ ID NO: 36**); stypR, 5'-TAC ACA TAT GTT CTT CCC TAA TAA-3' (**SEQ ID NO: 37**)) en 12,5 µl de mezcla de ADN SYBR Green suplementada con 0,5 µl de ROX (Invitrogen).

35 Los datos resultantes se usaron para calcular el número de TFD presentes por genoma.

40 6.1.5 Análisis de ARN

45 Los cultivos se trataron con reactivo protector de ARN (Qiagen) y las bacterias se recogieron como se ha descrito y se almacenaron a -80°C. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 µl de tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) que contenía 100 µg/ml lisostafina y se incubó a 37°C durante 30 min para lisar las células. Se añadieron 700 µl de tampón RLT (kit de extracción de ARN de Qiagen) y el ARN se recogió según el protocolo del fabricante. • Cualquier ADN restante se digirió usando una ADNasa I de Invitrogen, mezclando 2,5 µg de la muestra de ARN con 1,25 U de ADNasaI en 25 µl a temperatura ambiente durante 15 min. La enzima ADNasaI se desactivó añadiendo 2,5 µl de 25 mM EDTA y calentando a 65°C durante 10 min y el ARN tratado se usó para síntesis de ADNc usando síntesis de cebador aleatoria (NEB Protoscript). Usando métodos estándar de PCR en tiempo real, el ADNc se usó para cuantificar la transcripción relativa usando cebadores para el gen *fhu* (qSAfhuF, 5'-CGT CAA TCA TTG GTC CTA ACG GCT GC-3' (**SEQ ID NO: 38**); qSAfhuR, 5'-GCC ATC TGC TAC TTC AGG TGA TTG AGG-3' (**SEQ ID NO: 39**)) y normalizando usando niveles de ARNr 16S (usando los cebadores stypF y stypR; **SEQ ID NOs: 36 y 37**).

6.2 RESULTADOS

6.2.1 Transfección de TFD Fur en medio no limitante de hierro.

La disponibilidad del hierro influye en la regulación de cincuenta y nueve genes de *S. aureus* de los cuales se ha mostrado que diecisiete están regulados por Fur (Allard et al, Microbiol. Infect. (2006) 8: 1679-1690; Xiong et al, J. Infect. Dis. (2000) 181: 1020-1026; Horsburgh et al, J. Bacteriol. (2001a) 183: 468-475). Fur también actúa como un regulador positivo de algunos genes regulados por Per, incluyendo *katA*, que codifica una catálisis requerida para la resistencia al estrés oxidativo (Horsburgh et al, Infect. Immun. (2001b) 69: 3744-3754; Morrissey et al, Infect. Immun. (2004) 72: 972-979) y consecuentemente los mutantes *fur* están así comprometidos en su capacidad de prevenir la formación de radical hidroxilo tóxico. Estas propiedades reguladoras diversas y complejas pueden ser las responsables de la reducida virulencia del mutante *fur* de *S. aureus*. Para evaluar la aplicabilidad de la estrategia TFD para modular la actividad de Fur, se diseñó un TFD que incorpora el sitio de unión de Fur, que se había identificado previamente por experimentos de impronta realizados en el promotor *fhu* de *S. aureus* (Xiong et al. 2000). El TFD control consistió en una secuencia no relacionada con una composición en nucleótidos similar que no aparece en el genoma de *S. aureus*; esto fue para establecer si la acción del TFD Fur era específica de secuencia y 10 su había un efecto de producir la muerte causado sólo por el procedimiento de transfección. Cada secuencia de nucleótido se ligó en el vector de *Escherichia coli* pGEMTEasy y los plásmidos resultantes se usaron con cebadores que flanquean el sitio de inserción para generar los TFD por PCR. Los cebadores se modificaron rutinariamente en el extremo 5', parcialmente para incrementar la estabilidad de los TFD protegiéndolos de exonucleasas, pero 15 también para funcionalizar la molécula con colesterol (cebador directo) y un marcador cy5 (cebador inverso). Por lo tanto, las longitudes totales de los TFD fueron 60 pb para el TFD Fur y 62 pb para el TFD Control.

Para conseguir la transfección, los TFD se mezclaron con la preparación lipídica disponible comercialmente DOTAP para formar un complejo estable y proteger la carga negativa del núcleo fosfato. El complejo TFD-DOTAP se mezcló con *S. aureus* en BHI, un medio no limitante en hierro, que se había suplementado con 60 nM gramicidina. La gramicidina es un péptido antimicrobiano con actividad frente a las membranas de bacterias Gram-positivas (Herrell y Heilman, J. Clin. Invest. (1941) 20: 583-591). Experimentos previos por los inventores han establecido que concentraciones sub-letales de gramicidina eran suficientes para permitir la fusión del complejo TFD-DOTAP con la membrana bacteriana y captación del TFD. La adición de los reactivos de transfección junto con el TFD control resultó en una reducción de la velocidad de crecimiento de *S. aureus*. Esto se debe probablemente a alguna actividad bactericida causada a través del debilitamiento de la pared celular. La transfección usando 1 nM bien de TFD Fur o control resultó en curvas de crecimiento muy similares en un medio rico en hierro (Figura 9). De forma interesante, la inactivación de *fur* mostró un defecto en el crecimiento en medio rico (Horsburgh et al, 2001) mientras que no se observó diferencia entre la muestra tratada con control y Fur_TFD. Una explicación para la diferencia podría ser las diferentes condiciones decrecimiento (por ejemplo, baja aireación en las placas de 96 pocillos) y medios pero más pertinente podría ser las diferencias fundamentales entre una inactivación genética y los efectos 25 del tratamiento con TFD. El Fur_TFD prevendrá la unión de cualquier factor de transcripción capaz de unirse a ese sitio, no sólo la proteína Fur sino proteínas adicionales que se unen al mismo sitio. Se está aceptando cada vez más que la regulación transcripcional en bacterias es más compleja de lo que se pensaba previamente y, como en eucariotas, tiene contribuciones de muchas redes reguladoras y por lo tanto es modular, con más de un factor de transcripción influyendo en la expresión (Barnard et al, Curr. Opin. Microbiol. (2004) 7: 102-108).

40 Se realizó PCR cuantitativa para establecer si la transfección de la célula había ocurrido y si era así cuántos TFD habían entrado por genoma. En ausencia de gramicidina y DOTAP, los TFD no se detectaron en el interior de o unidos a las células bacterianas, lo que demuestra que los TFD no entran en las células espontáneamente y que el procedimiento de lavado había eliminado con éxito cualquier TFD asociado no específicamente con la superficie 45 celular. En presencia de los reactivos de transfección, Fur y el TFD Control se detectaron a 4.500 y 5.340 TFD por genoma, respectivamente (Figura 10A). Por lo tanto, el procedimiento de transfección estaba administrando un número sustancial de ambos TFD a las células bacterianas sin tener ningún efecto diferencial observable en el crecimiento en medio rico en hierro.

6.2.2 Expresión de *fhu* controlada por TFD.

Si el Fur_TFD estaba actuando para unir Fur y así prevenir que se uniera al promotor *fhu* se esperaría que la represión de los genes *fhu* debería eliminarse. Para ensayar esto, se comparó el número de copias de los transcritos de *fhu* (estandarizado respecto al ADN ribosomal) presentes en la muestra tratada con Fur_TFD con la muestra Control (Figura 10B). La realización de RT-PCR cuantitativa en tiempo real en ARN aislado de las muestras mostradas en la Figura 9 estableció que el Fur_TFD había producido el cambio predicho en la transcripción de *fhu*: era cinco veces mayor que en la muestra Control. Por lo tanto, la transfección de TFD específicos puede usarse para modificar los patrones de expresión de genes en *S. aureus* que se sabe que son esenciales para la patogenicidad.

6.2.3 Efecto en el crecimiento de TFD Fur en medio con hierro limitante

Usando el mismo protocolo de transfección, los TFD Fur y Control se introdujeron en *S. aureus* cultivado en un medio con hierro limitado (Skaar et al, Science (2004) 305: 1626-8). Como se esperaba, el crecimiento se retrasó en

este medio cuando se compara con el crecimiento en BHI. Sin embargo, el cultivo que se había transfectado con el TFD Fur no mostró ningún signo de crecimiento durante el curso del experimento (Figura 11), lo que demuestra que la perturbación de la regulación del hierro en condiciones con hierro limitado es perjudicial para el crecimiento y reproduce los resultados observados con el mutante con inactivación de Fur (Horsburgh *et al.*, 2001a).

Generalmente se piensa en el factor de transcripción Fur como un represor que actúa globalmente que regula a la baja la transcripción de los genes de captación de hierro en condiciones en las que el hierro está en exceso, previniendo la toxicidad del hierro, que está causada por la reacción de Fenton (Wandersman y Delepelaire, *Ann. Rev. Microbiol.* (2004) 58: 611-647). La mutación de *fur* de *S. aureus* también tiene un efecto perjudicial en la virulencia con una incapacidad de crecer en condiciones limitantes de hierro, resultando en una atenuación *in vivo* (Horsburgh *et al.* 2001a). Las razones para esto permanecen sin aclararse, pero quizás reflejan el papel central de Fur en la adaptación de las bacterias a cambios en el medioambiente, y una capacidad comprometida para responder al estrés oxidativo. El efecto en la virulencia no parece ser único para *S. aureus*. La mutación de *fur* causa la atenuación de *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Bacillus cereus* *in vivo* (Mey *et al.*, *Infect. Immun.* (2005) 73: 8167-8178; Palyada *et al.*, *J. Bacteriol.* (2004) 186: 4714-4729; Bury-Mone *et al.*, *Mol. Microbiol.* (2004) 53: 623-638; Jacobsen *et al.*, *Infect. Immun.* (2005) 73: 3740-3744; Harvie *et al.*, *Microbiol.* (2005) 151: 569-577). El análisis bioinformático de la secuencia consenso de Fur de *S. aureus* (usando software MEME (http://meme.sdsc.edu/meme4_1/intro.html) y secuencias previamente identificadas (Horsburgh *et al.* 2001a) demostró que estaba altamente conservada en *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Lysteria monocytogenes* así como en *S. aureus* (Figura 12), lo que predice una actividad frente a otros Bacillales.

Se han usado moléculas antisentido para tratar bacterias patogénicas. Más especialmente usando núcleos modificados, tales como ácidos nucleicos peptídicos (Good y Nielsen, *Nat. Biotech.* (1998) 16: 355-358) y oligonucleótidos morfolino (Shen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2009) 106: 8163-8168) y consiguiendo la administración con péptidos catiónicos. Éstos regulan a la baja la traducción de ARNm diana a concentraciones micromolares para inhibir el crecimiento de microbios *in vitro* e *in vivo*. El cambio a núcleos modificados tiene las ventajas de que incrementa la estabilidad del oligonucleótido en fluidos biológicos y reduce o elimina la carga negativa del núcleo fosfato. Este último efecto tiene la ventaja de que los oligonucleótidos modificados son más fáciles de transfectar a través de la membrana externa cargada negativamente de las bacterias. Sin embargo, como los TFD funcionan interfiriendo con las interacciones ADN-proteína y es probable que el núcleo fosfato sea importante para el reconocimiento de proteínas no puede reemplazarse fácilmente.

En este ejemplo, se ha demostrado que los TFD, como oligonucleótidos grandes con núcleos naturales, pueden administrarse eficazmente a las células, usando una combinación de péptidos y liposomas para matar a las bacterias a concentraciones nanomolares. Los TFD son eficaces a concentraciones mucho más bajas ya que bloquean un proceso enzimático (transcripción) mientras que el antisentido funciona como bloques estéricos en los productos de la transcripción (ARNm). Una ventaja adicional de usar TFD es que bloquean la expresión de muchos genes esenciales, en lugar de tener una única diana, lo que les hace menos susceptibles a los mecanismos de resistencia.

Ejemplo 7

TFD Sig inhibe el crecimiento de cepas MRSA

Se prepararon polinucleótidos señuelo marcados con Colesterol/Cy5 como en el Ejemplo 5.1. Típicamente, se formó un complejo con 1 µg de TFD Sig y 0,3 µl del reactivo de transfección liposomal DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonio propano; Roche) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Los ensayos para determinar su efecto en el crecimiento de células bacterianas se realizaron usando placas de 96 pocillos, conteniendo cada pocillo 200 µl de caldo que consistía en medio BHI (Becton Dickinson) suplementado con 60 nM Gramicidina (Sigma Corporation. Cat# G5002). Se añadió 1 µl de varias concentraciones de un señuelo marcado con Colesterol/Cy5 formando un complejo con TFD a cada pocillo y se monitorizó el efecto en el crecimiento bacteriano de aislados clínicos de *S. aureus* que se había determinado que eran cepas resistentes a meticilina (MRSA). El crecimiento se monitorizó midiendo la absorbancia del caldo a intervalos de tiempo durante la incubación. Las placas se incubaron a 37°C con agitación y se tomaron lecturas de absorbancia (a 450 nM) usando un lector de placas.

Como se muestra en la Figura 13, fue evidente que el tratamiento con tan poco como 10 nM Sig previno el crecimiento de las cepas MRSA en medio BHI. Una cantidad similar de TFD control que contenía una secuencia no relacionada con una longitud similar no encontrada en el genoma de *S. aureus* no tuvo efecto en el crecimiento bacteriano en este medio.

Ejemplo 8

TFD Sig potencia la acción de antibióticos frente a EMRSA15 (una cepa epidémica aislada clínicamente)

Se preparó TFD Sig en forma de mancuerna como se describe en el Ejemplo 9.1 (véase más adelante). Se realizó un ensayo de crecimiento como se describe en el Ejemplo 5.2 con una cepa MRSA bien caracterizada, EMRSA15.

Esta cepa muestra resistencia a meticilina (siendo capaz de crecer en 2 mg/ml de los antibióticos), 0,5 mg/ml eritromicina y 0,5 mg/ml Ciprofloxacina (Porter y Damani, J. Hospital Infection (2007) 65: 88).

Como se muestra en la Tabla 1 más adelante, la cepa EMRSA15 se resensibilizó a meticilina, eritromicina y ciprofloxacina, en presencia de 10 nM de TFD Sig, como se mide determinando el tiempo de latencia en el crecimiento del cultivo bacteriano. En dichos experimentos, un tiempo de latencia de 0 h para el medio tratado con TFD Control (como se describe en el Ejemplo 5.1) y un antibiótico indica que el cultivo empezó a crecer en el mismo punto de tiempo que las bacterias no tratadas crecidas en medio suplementado con el antibiótico. Para los cultivos tratados con el TFD Sig, el tiempo de latencia es el retraso en el crecimiento comparado con el observado con el TFD Control en presencia de antibiótico. Por lo tanto, los tiempos de latencia de 6,4 h (en presencia de 2 mg/ml de meticilina), 8,2 h (en presencia de 0,5 mg/ml de eritromicina) y 8,3 h (en presencia de 0,5 mg/ml de Ciprofloxacina) indican que el TFD Sig actuó sinérgicamente con estos antibióticos para retrasar el crecimiento.

El mecanismo para este efecto es probable que sea que el TFD Sig previene o regula a la baja la inducción mediada por antibiótico del regulón de respuesta al estrés, haciendo que las células sean más sensibles. Como la mayor parte de los antibióticos causan respuesta al estrés se esperaría que si los TFD se usaran en combinación se incrementaría la eficacia de todos o la mayoría de dichos antibióticos.

Tabla 1

Antibiótico	Tiempo de Latencia del TFD Control (h)	Tiempo de Latencia del TFD Sig (h)
Meticilina 2 mg/L	0,2	6,4
Eritromicina 0,5 mg/L	-0,3	8,2
Ciprofloxacina 0,5 mg/L	0,3	8,3

El tiempo de latencia se define como el tiempo en el que el crecimiento está retrasado (en comparación con un cultivo con transfección simulada) debido al tratamiento del TFD.

20 Ejemplo 9

Los TED Sig en configuración de mancuerna reprimen el crecimiento de una cepa MRSA aislada clínicamente

9.1 Preparación de TFD en forma de mancuerna por ligación (DB-TFD)

Se sintetizaron dos oligonucleótidos, cada uno conteniendo una cadena del sitio de reconocimiento para la proteína sigma alternativa de *S. aureus*. En cada extremo de la molécula un pequeño bucle en horquilla actuó para proteger a la molécula de la degradación. Cada oligonucleótido se re-suspendió en dH₂O a una concentración de 250 pmoles/μl.

Para formar el TFD Sig en forma de mancuerna (referido como TFD SA3) se sintetizaron los oligonucleótidos fosforilados siguientes:

SEQ ID NO: 40 – SigDB_SA3: CTTGG TTTTT CCAAG GAA GAT TAG AAA TTA
TTT CGA T GGG TAT ATA ATA

**SEQ ID NO: 41 – SigDB_SA3: P-CCG TCT TTT TGA CGG TAT TAT ATA CCC ATC
GAA ATA ATT TCT AAT CTT C**

30 Cuando se hibridan éstos formaron la molécula siguiente:

T CCAAG gaa gat tag aaa tta ttt cgat ggg tat ata ata PCCCCCTT
 TTT TTT
 T GGTTCPTTCTAAATCCTTAAATAAAACGTAACCCATAATAATATGGCAGT

Típicamente, 30 μ l de cada oligonucleótido se mezclaron con 27 μ l de dH₂O y se hibridaron usando el programa de PCR siguiente: HIBRIDACIÓN: 95°C 3 min, enfriamiento a -0,1°C/s hasta 8°C, final. Después de lo cual, se

añadieron 10 µl de tampón Ligasa 10xNEB y 3 µl ADN ligasa HC T4 (NEB). La mezcla se incubó toda la noche a 16°C. El material se digirió extensamente con exonucleasa T7 (NEB) para eliminar cualquier oligonucleótido no ligado y se recuperó por dos rondas de precipitación con etanol.

- 5 También se preparó un DB_TFD que contenía una versión desorganizada del sitio de unión Sig. En este caso, los cebadores fosforilados usados fueron:

**SEQ ID NO: 42 – SigScr_SA1: CTTGG TTTT CCAAG TAG AAA GAA GAT TTA
GGG CGA T TTT ATA ATA TAT**

**SEQ ID NO: 43 – SigScr_SA2: CCG TCT TTT TGA CGG ATA TAT TAT AAA ATC
GCC CTA AAT CTT CTT TCT A**

9.2 Realización de estudios de crecimiento en placas de 96 pocillos

Se realizó un ensayo de crecimiento como se describe en el Ejemplo 5.1 usando el TFD Sig en su configuración en mancuerna y una cepa MRSA aislada clínicamente.

- 10 Como se muestra en la Figura 14, las concentraciones de TFD Sig tan bajas como 10 nM pudieron inhibir el crecimiento celular, mientras que una concentración similar del TFD control no pudo.

Ejemplo 10

DB-TFD WalR previene el crecimiento de EMRSA15

10.1 Preparación de DB TFD que contienen sitio de unión WalR

- 15 La secuencia de unión para WalR se incorporó en oligonucleótidos en forma de mancuerna y se prepararon como se describe en el Ejemplo 9.1. Las secuencias de estos oligonucleótidos fosforilados fueron:

**SEQ ID NO: 44 – WalRDB2.1: CTTGG TTTT CCAAG TAA TGA ATG A GTT TAA
AGC CCA TGT AAA AG GGG TAT CAG TAC**

**SEQ ID NO: 45 – WalRDB2.2: CCC TCT TTT TGA GGG GTA CTG ATA CCC CTT
TTA CAT GGG CTT TAA ACT CAT TCA TTA**

Una segunda pareja de oligonucleótidos que contenía una versión desorganizada del sitio de unión WalR se usó para generar la estructura en mancuerna control (Scr.WalR). Las secuencias de estos oligonucleótidos fosforilados fueron:

**SEQ ID NO: 46 – WalRDB3.1: P-CTTGG TTTT CCAAG GTA ATA TGA C AAG ATT
GTA AAT GAC CTA GTT GAG AG ATGCCA**

**SEQ ID NO: 47 – WalRDB3.1: P-CCC TCT TTT TGA GGG TGG CAT CTC TCA ACT
AGG TCA TTT ACA ATC TTG TCA TAT TAC**

10.2 Transfección de EMRSA15 por co-tratamiento con Lisostafina

Se realizaron ensayos de crecimiento como se describe en el Ejemplo 7.1 con la única diferencia de que el medio se suplementó con entre 0,5 y 2,5 pg/ml de Lisostafina en lugar de Gramicidina. La Lisostafina es una enzima semejante a lisozima que es específica para las paredes de *S. aureus*.

Como puede observarse en la Figura 15, tan poco como 10 nM de DB-TFD Sig fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, mientras que cantidades similares del DB-TFD control no tuvieron efecto.

Ejemplo 11**TFD WalR inhibe el crecimiento de MRSA en un modelo de sepsis en ratón**

El TFD usado en este Ejemplo bloquea la acción del sistema de dos componentes WalKR. Estas proteínas forman una ruta de transducción de la señal esencial que controla la expresión de un pequeño regulón de genes implicado en el metabolismo de la pared celular, particularmente la síntesis de peptidoglicano.

5

11.1 MÉTODOS**11.1.1 Cepas bacterianas y crecimiento**

Se crecieron cultivos de *S. aureus* EMRSA16 y se mantuvieron en medio BHI (Becton Dickenson). Se prepararon 10 preparaciones madre congeladas mezclando volúmenes iguales de un cultivo en crecimiento exponencial temprano (DO de 0,3 a A₆₀₀) con 50% glicerol y congelando a -80°C.

10

11.1.2 Preparación de TFD

Se prepararon TFD en una configuración en mancuerna como se ha descrito previamente (Ahn et al, 2003). Los TFD 15 se prepararon ligando parejas de oligonucleótidos fosforilados para formar un TFD que contenía el sitio de unión para la proteína WalR como aparece en el promotor de lytM (WalR_TFD) o un TFD que contenía una versión desorganizada del sitio de unión (Scr_TFD). Los oligonucleótidos se resuspendieron a una concentración final de 20 100 pmoles/μl en un tampón de ADN ligasa T4 (New England Biolabs) y 400 U de ADN ligasa T4 y se incubó a 16°C toda la noche. La mañana siguiente el tampón de reacción se suplementó con 10 U Exonucleasa I (NEB) y se digirió durante 30 min a 37°C antes de purificar por extracción con fenolcloroformo y precipitación con etanol. Los TFD se resuspendieron en agua a una concentración de 1 mM.

20

Las secuencias de las parejas de oligonucleótidos usados para formar WalR_TFD fueron:

**SEQ ID NO: 48 - WalR1: 5'- P-CTT GGT TTT TCC AAG TAA TGA ATG AGT TTA
AAG CCC ATG TAA AAG GGG TAT CAG TAC- 3'**

y

**SEQ ID NO: 49 - WalR2: 5'- P-CCC TCT TTT TGA GGG GTA CTG ATA CCC CTT
TTA CAT GGG CTT TAA ACT CAT TCA TTA- 3'.**

25

Para Scr_TFD las secuencias fueron:

**SEQ ID NO: 46 – WalRDB3.1: 5'- P-CTT GGT TTT TCC AAG GTA ATA TGA CAA
GAT TGT AAA TGA CCT AGT TGA GAG ATG CCA- 3'**

y

**SEQ ID NO: 47 – WalRDB3.1: 5'- P-CCC TCT TTT TGA GGG TGG CAT CTC TCA
ACT AGG TCA TTT ACA ATC TTG TCA TAT TAC- 3'.**

11.1.3 Transfección de MRSA *in vitro*

30 Se formaron complejos TFD-DOTAP mezclando 1 μg de TFD con 2 μg de DOTAP (Roche) e incubando a temperatura ambiente durante 10 min en la mesa de trabajo. El complejo de TFD se mezcló con medio inoculado suplementado con 10 ng/ml de Lisostafina (Sigma; L9043), se alicuotó en placas de 96 pocillos con fondo plano y el crecimiento se analizó mediante cultivo a 37°C con agitación en un lector de placas BioTek.

11.1.4 Modelo de sepsis en ratón

35 El estudio de sepsis en ratón se realizó por Euprotec (Reino Unido). Los ratones usados en este estudio, ratones CD1 macho, fueron suministrados por Charles River (Margate, Reino Unido) y carecían de patógenos específicos (16-18 g en la entrega). Todos los ratones pesaron 22-25 g al comienzo del experimento.

11.1.5 Estudio de tolerabilidad

Para el estudio de tolerabilidad, los animales se trataron en grupos de 2 ratones por grupo de tratamiento, por lo tanto 10 en total para el estudio. Todos los ratones se pesaron en el día 1 del estudio y se pusieron aleatoriamente en cajas. Los ratones tenían los tratamientos siguientes administrados intravenosamente usando 10 ml/kg, los cinco grupos de tratamiento fueron: 100 μ M WalR_TFD; 2,5 mM DOTAP; 6,3 μ G/ml Lisostafina; una mezcla de TFD/DOTAP/Lisostafina; disolución salina. Los ratones se pesaron diariamente después del tratamiento durante un periodo de 100 h antes de ser sometidos a eutanasia y los pulmones, hígado, bazo y riñones se extrajeron y examinaron visualmente y se pesaron.

11.1.6 Estudio PK

Para el estudio PK, los animales se trataron en grupos de 3 ratones por punto de tiempo, por lo tanto 24 en total para el estudio. Los ratones se trataron con administración intravenosa de una mezcla de 5 nM/kg WalR_TFD, 25 nM/kg DOTAP, 31,5 m/kg Lisostafina. Se extrajo sangre de los conjuntos de ratones por punción cardiaca después de anestesia con isofluorano a los 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas y 24 horas después de la dosis. Todas las muestras se recogieron como plasma (anticoagulado con heparina y almacenado en hielo antes de la separación). Después de la recogida de sangre, los riñones se extrajeron y homogeneizaron en 1 ml de PBS enfriado en hielo. Los TFD se detectaron en las muestras biológicas con cPCR.

11.1.7 Estudio de carga tisular

Para el estudio de carga tisular, los animales se trataron en grupos de 8 ratones por grupo de tratamiento, por lo tanto 48 en total para el estudio. Se prepararon cultivos 2 x 10 ml de *Staphylococcus aureus* EMRSA 16 y se pusieron en agitador orbital (220 rpm) toda la noche a 37°C. Al día siguiente, los cultivos de *Staphylococcus aureus* EMRSA 16 se quitaron del agitador, se sedimentaron y se lavaron dos veces antes de resuspenderlos en disolución salina hasta una DO de 0,132 ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml). Esta disolución madre de *Staphylococcus aureus* EMRSA 16 se diluyó más 1:1,5 en disolución salina (1 x 108 cfu/ml), es decir, $2,0 \times 10^7$ bacterias por ratón. Se infectaron 48 ratones con 0,2 ml de la suspensión 1,0 x 108/mL. El número de bacterias *Staphylococcus aureus* EMRSA 16 por mL en el resto de las suspensiones después de la inoculación también se contó para confirmar la carga de infección. Los ratones se trataron 1, 9 y 17 horas después de la infección con el compuesto o vehículo, aunque la vancomicina sólo se administró después de 1 h. Los tratamientos fueron como previamente una mezcla de TFD/DOTAP/Lisostafina usando una concentración de 1nM/kg TFD en una proporción molar 5:1 con DOTAP y 63 μ g/kg Lisostafina. Después de 25 horas después de la infección, todos los animales se pesaron y se sometieron a eutanasia. Los riñones se extrajeron inmediatamente y se homogeneizaron en disolución salina tamponada con fosfato estéril enfriada en hielo + 0,05% Tween 80. Los homogenados de órganos se cultivaron cuantitativamente en agar CLED y se incubaron a 37°C durante hasta 3 días y se contaron las colonias. Los datos de las cargas del cultivo se analizaron por el ensayo de Kruskal-Wallis usando Stats Direct.

11.2 RESULTADOS

11.2.1 WalR_TFD mata rápidamente el crecimiento de MRSA *in vitro*

En experimentos de inactivación génica se ha mostrado que el sistema de dos componentes altamente conservado WalK/WalR (también referido como YycG/YycF) es esencial para la viabilidad en *S. aureus* y otros patógenos Gram-positivos. El sitio de unión para el factor de transcripción WalR se ha identificado en varios promotores de genes en el regulón, incluyendo lytM/SA0265 (Dubrac, Boneca *et al.* 2007). Fue esta versión la que se usó en el WalR_TFD y una versión desorganizada en la que la secuencia se re-organizó aleatoriamente, Scr_TFD.

En el estudio, se usó EMRSA-16, una cepa MRSA endémica en los hospitales del Reino Unido (Cox, Mallaghan *et al.* 1995). Los TFD se mezclaron con una formulación lípida disponible comercialmente, DOTAP, y se mezcló con medio inoculado con EMRSA-16 y Lisostafina. La Lisostafina es un agente lisozima que actúa en las paredes de *S. aureus*, el uso de ésta en este experimento fue para adelgazar la capa de peptidoglicano externa de las bacterias y permitir al TFD transfectar la célula después de la fusión del vehículo DOTAP con la membrana interna expuesta de la bacteria. Usando este protocolo de transfección se observó que el tratamiento con el TFD control, Scr_TFD, no tuvo un efecto detectable en el crecimiento bacteriano cuando se compara con una muestra no tratada. Sin embargo, el WalR_TFD previno el crecimiento de EMRSA-16 *in vitro* a una concentración de 1 nM (Figura 16). Las cuentas viables totales confirmaron los resultados de que el tratamiento con WalR_TFD redujo el número de células vivas cinco órdenes de magnitud (Figura 17A). Las bacterias que no fueron matadas por el tratamiento con WalR_TFD se sub-cultivaron con el fin de determinar si había alguna incidencia de resistencia. El proceso se repitió un total de cuatro veces y se registró tanto la reducción en las cuentas viables (Figura 17B) como las curvas de crecimiento *in vitro* (Figura 17C, cuadrados negros: bacterias en el cuarto subcultivo). Por lo tanto, ausencia de evidencia del desarrollo de un mecanismo de resistencia frente a la muerte mediada por TFD.

Con el fin de determinar si los TFD mataban bacterias en contacto o necesitaban una exposición prolongada para funcionar, se transfeció EMRSA-16 con 1 nM de complejo WalR_TFD/DOTAP y se incubó durante 30 minutos antes de microdiluirse en medio fresco, sin ningún complejo de TFD o Lisostafina. El crecimiento *in vitro* se siguió durante

48 horas adicionales (Figura 18) y fue evidente que no se observó ningún crecimiento, lo que confirma que los TFD mataban efectivamente a las células en un primer contacto.

11.2.2 Estudio de tolerabilidad

Todos los fármacos fueron bien tolerados después de administración IV; no hubo eventos agudos indicados. Despues del tratamiento, los ratones se comieron y bebieron con normalidad sin signos de distrés. El incremento en el peso de los ratones tratados fue el mismo que el de los controles con vehículo. La autopsia no mostró anomalías gruesas de los riñones, pulmones, hígado o tracto GI. Los pesos de los riñones, pulmones e hígado estuvieron en el rango normal. Todos los compuestos de ensayo se toleran y son adecuados para una dosificación adicional hasta la dosis máxima usada en este estudio de tolerabilidad.

11.2.3 Estudio de carga tisular

La dosis infecciosa administrada se dirigió a $2,0 \times 10^7$ bacterias por ratón para asegurar una infección relativamente suave se estableció (ésta es más sensible a tratamiento). Los ratones se trataron con inyección sistémica bien del vehículo, 1 nM del complejo Scr_TFD, 1 nM del complejo WalR_TFD o vancomicina, usados a una concentración suficiente para conseguir una reducción de 2 veces en las unidades formadoras de colonias (cfu). Despues del tratamiento, los ratones se sacrificaron y se midió la carga encontrada en los riñones (Figura 19). El análisis estadístico de los resultados mostró que los ratones tratados con el WalR_TFD consiguieron una reducción similar en la carga a la conseguida por vancomicina cuando se compara con el control Scr_TFD (Tabla 2, más adelante).

Tabla 2. Análisis estadístico de los resultados *in vivo*. Kruskal-Wallis: todas las comparaciones por parejas (Dwass-Steel-Chritchlow-Fligner) para Scr_TFD

	1 nM Scr_TFD	1 nM WalR_TFD	Vancomicina	Vehículo
1 nM Scr_TFD		0,0043	0,0062	0,7804
1 nM WalR_TFD			0,2549	0,0062
Vancomicina				0,0173
Vehículo				

Se encontró que el WalR_TFD en este experimento tiene una actividad bactericida rápida a concentraciones nanomolares frente a MRSA tanto *in vitro* como *in vivo*.

Ejemplo 12

Transfección de *E. coli* con TFD FabB sensibiliza a las bacterias a antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos grasos

12.1 Preparación de TFD FabB

Los TFD FabB se diseñaron para incorporar el sitio de unión para el regulador transcripcional de las enzimas de la síntesis de ácidos grasos, FadR, que aparece en 5' del gen FabB en *Escherichia coli*. El gen FabB codifica una enzima implicada en la síntesis de ácidos grasos (J. Bacteriology (2005) 183: 5292).

Se prepararon TFD por PCR como se describe en el Ejemplo 4.1 con la excepción de una parte de 60 pares de bases del promotor FabB que se clonó en el vector pGEMT-Easy. Los oligonucleótidos usados para amplificar la secuencia del promotor fueron:

SEQ ID NO: 50 - fabBf: TCT TTA AAT GGC TGA TCG GAC TTG
SEQ ID NO: 51 - fabBr: AGT AAG TTT CGA ATG CAC AAT AGC GTA

También se generó un TFD control que tiene la secuencia que dio lugar a un fragmento de PCR con un tamaño similar cuando se usó en una reacción de amplificación con ADN genómico aislado de *Mycobacterium smegmatis*. Las secuencias de estos oligonucleótidos fueron:

SEQ ID NO: 52 - WhiB7.f: CAC CAG CCG AAA AGG CCA CGG
SEQ ID NO: 53 - WhiB7.r: CAA AAA TGG CCA CGG ATC CGG GTG

12.2 Ensayos de crecimiento

El efecto de los TFD en el crecimiento de cultivos bacterianos de *E. coli* se midió como se describe en el Ejemplo 4.1 con unas pocas modificaciones: el medio usado fue LB; el co-transfectante usado fue 40 nM polimixina, en lugar de

gramicidina; el medio también se suplementó con 10 µg/ml Cerulenina (CER). CER es un antibiótico que actúa en la síntesis de ácidos grasos. A las concentraciones usadas no tiene efecto perceptible en el crecimiento de *E. coli*.

La Figura 20 muestra que el tratamiento de *E. coli* con 10 nM del TFD FabB, pero un TFD control (WhiB7; que contiene una secuencia que se sabe que no aparece en el genoma de *E. coli*), volvió a las bacterias sensibles a la acción de cerulenina. El antibiótico usado, cerulenina (CER), empieza a inhibir el crecimiento celular en presencia del TFD control a 20 µg/ml, punto en el cual las células estaban siendo matadas por la acción sinérgica del TFD FabB.

Como el TFD FabB está diseñado para regular a la baja los genes del operón de la síntesis de ácidos grasos, nuestra hipótesis es que este TFD podría usarse en combinación con cualquier antibiótico que bien perturbe la síntesis de ácidos grasos, directamente o indirectamente, para incrementar la eficacia de ese antibiótico o contrarreste un mecanismo de resistencia.

Ejemplo 13

La transfección de un TFD que contiene la secuencia de reconocimiento para el factor σ54 de *Klebsiella pneumoniae* retarda el crecimiento bacteriano

Se preparó por PCR y se ensayó un TFD que contiene el sitio de unión para el factor sigma alternativo, σ54, del organismo patogénico *Klebsiella pneumoniae*. Comparado con la actividad de un TFD control no relacionado, el TFD Sig inhibió el crecimiento de las células. σ54 es otro ejemplo de un factor sigma que controla la regulación de la respuesta al estrés en bacterias.

13. 1 Preparación de TFD

El TFD se preparó como se describe en el Ejemplo 5.1. Las secuencias de los oligonucleótidos hibridados usados fueron:

SEQ ID NO: 54 - Ks54f: P-CCG ATA AGG GCG CAC GGT TTG CAT GGT TAT A

SEQ ID NO: 55 - Ks54r: P-ATA ACC ATG CAA ACC GTG CGC CCT TAT CGG A

*13.2 Transfección de *K. pneumoniae**

Los ensayos de crecimiento se realizaron como se describe en la Sección 4.1 siendo la diferencia que el medio usado fue medio M9 (Sambrook et al (1989) Molecular Cloning. 2^a Edición vol. 3 p. A3). El medio no se suplementó con ningún co-transfectante.

La transfección se consiguió formando un complejo del TFD con un péptido que penetra en las células. El péptido consistió en dos partes: una cadena lineal de nueve D-argininas y una secuencia peptídica previamente descrita que se encontró que era capaz de penetrar la membrana de *K. pneumoniae* (Vaara, Antimicrobial Agents and Chemotherapy (1996) 40: 1801). Las argininas (R9) cargadas positivamente sirven para unir el núcleo fosfato del TFD mediante una interacción de carga. El uso de dichas colas R9 para formar un complejo de los restos transfectantes para transfectar bacterias se ha descrito previamente (Kim, Molecular Therapy (2006) 14: 343). La secuencia completa del péptido usado fue:

SEQ ID NO: 56-IKFLKFLKFL-(D-arginina) 9

Los TFD se mezclaron con cantidades crecientes de péptido IKFLKFLKKL-R9 en un tampón basado en TE suplementado con 5% glucosa. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y se usó bien directamente en transfecciones o se analizó por electroforesis en gel de agarosa. Típicamente, se usó la cantidad mínima de IKFLKFLKKL-R9 que causaba que el complejo con ADN no corriera en el gel; es decir, la carga del núcleo de ácido nucleico se había neutralizado por unión de poli-arginina. Los conjugados IKFLKFLKKL-R9-TFD se mezclaron a varias concentraciones en 200 µl de cultivo en una placa de 96 pocillos.

La Figura 21 muestra que 10 nM de TFD Sig fue suficiente para inhibir el crecimiento del cultivo de *K. pneumoniae*, mientras que no se observó inhibición con el TFD control.

Ejemplo 14

Análisis bioinformático para detectar las apariciones de los sitios de unión WalR en *S. aureus* y deducir su secuencia consenso.

Se usó una búsqueda MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme4/cgi-bin/meme.cgi>) para encontrar apariciones adicionales de ejemplos publicados del sitio de unión WalR en *S. aureus* (SA) y otros organismos patogénicos en los que se encontró que aparecía, tales como *Enterococcus faecium* (EF), *Streptococcus pneumoniae* (SP), *Lysteria monocytogenes* (LM) y *Streptococcus mutans* (SM).

Un subconjunto de los aciertos derivados de la búsqueda se muestra en la Figura 22. A partir del conjunto completo, se derivó un sitio consenso, que tiene la secuencia:

TGT WAW NNN NNT GTA AW [SEQ ID NO: 57]

Se usa el código de una letra de la IUPAC, en el que: W es A o T.

- 5 Por lo tanto, se espera que la secuencia consenso de TFD WalR influya en el crecimiento de los organismos listados anteriormente.

Ejemplo 15

Análisis bioinformático para detectar las apariciones de los sitios de unión SigB en *S. aureus* y deducir su secuencia consenso.

- 10 Se usó una búsqueda MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme4/cgi-bin/meme.cgi>) para encontrar ejemplos de apariciones (con valores E < 100) de concordancias con una secuencia consenso del sitio de unión SigB en *S. aureus* y Bacillales (infecciones Gram-positivas) de los que los géneros representativos incluyen *Bacillus*, *Listeria* y *Staphylococcus*.

- 15 Los ejemplos de los aciertos derivados de la búsqueda se muestran en la Figura 23. A partir del conjunto completo, se derivó un sitio consenso, que tiene la secuencia:

GKT TWA NNN NNN NNN NNK GGT AW [SEQ ID NO: 58]

Se usa el código de una letra de la IUPAC, en el que: K es G o T; W es A o T.

Ejemplo 16

- 20 Análisis bioinformático para detectar las apariciones de los sitios de unión Sig en *Klebsiella pneumoniae* y deducir su secuencia consenso.

Se tomó un TFD que contiene el sitio de unión para el factor sigma alternativo (sigma 54) de la región del promotor del gen *glnA* de *K. pneumoniae*, como se describe en Barrios et al. 1999 (Nucl. Acids Res. 22: 4305-4313) y, cuando se incorpora en un PCR_TFD, se mostró que mata a las células de *K. pneumoniae* *in vitro* (véase la Figura 24A).

La secuencia de TFD usada fue:

- 25 **SEQ ID NO: 59 - KP_Sig TGG CAC aga ttT CGC T |**

Las células se transfecaron como se describe en el Ejemplo 13, usando un péptido que penetra en las células. El TFD que contiene la secuencia KP_Sig previno el crecimiento celular *in vitro* mientras los dos controles no mostraron efecto en el crecimiento celular. Los dos controles usados fueron: células no tratadas (*K. pneumoniae*) y un TFD control que consiste en una secuencia desorganizada.

- 30 Se usaron sitios de unión similares encontrados en otros genes de *K. pneumoniae* (*nifB*, *nifE*, *nifH*, *nifJ*, *nifL*, *nifM* y *nifU*) para definir una secuencia consenso:

SEQ ID NO: 60 - TGG NNN NNN WTT TGC W |

Se usa el código de una letra de la IUPAC, en el que W es A o T.

Solicitante de la Organización

- 35 Calle : Norwich Bio-Incubator, Norwich Research Park, Colney Lane

Ciudad : Norwich

Estado :

País : UK

Código Postal: NR4 7UH

- 40 Número de teléfono:

Número de fax:

Dirección de correo electrónico:

<110> Nombre de la Organización: Procarta Biosystems Limited

Proyecto de la solicitud

<120> Título: Transcription Factor Decoys

<130> Referencia Archivo Solicitud: P3950WO

5 <140> Número Actual Solicitud:

<141> Fecha Presentación Actual: --

Solicitudes Anteriores

<150> Número de Solicitud Anterior: US 61/102.414

<151> Fecha de Solicitud Anterior: 03-10-2008

10 Solicitudes Anteriores

<150> Número de Solicitud Anterior: US 61/167.592

<151> Fecha de Solicitud Anterior: 04-08-2009

Solicitudes Anteriores

<150> Número de Solicitud Anterior: GB 09069130

15 <151> Fecha de Solicitud Anterior: 08-04-2009

Solicitudes Anteriores

<150> Número de Solicitud Anterior: PCT/GB2008/003353

<151> Fecha de Solicitud Anterior: 03-10-2008

Secuencia

20 <213> Nombre de Organismo:

<400> Cadena de presecuencia:

ggccgccttg gcggccgcgg gaattc 26

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 26

25 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 1

Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo:

<400> Cadena de presecuencia:

30 aggccggccgc gaattcacta gtg 23

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 23

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 2

Descripción de Secuencia:

35 Secuencia

<213> Nombre de Organismo:

<400> Cadena de presecuencia:
 ctgggtttt ccaagagaag agccgcctat ggcggccg ggaattc 47
 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 47

5 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 3
 Descripción de Secuencia:
Secuencia
 <213> Nombre de Organismo:
 <400> Cadena de presecuencia:
 10 ccgtctttt gacggcgaag agcaggcgcc cgcaattca ctatgt 47
 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 47
 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 4
 Descripción de Secuencia:
 15 Secuencia
 <213> Nombre de Organismo: M. smegmatis str MC2 155
 <400> Cadena de presecuencia:
 tggccacgga tccgggtgac tgccggtcg tggcct 36
 <212> Tipo: ADN
 20 <211> Longitud: 36
 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 5
 Descripción de Secuencia:
Secuencia
 <213> Nombre de Organismo: E. coli str K12
 25 <400> Cadena de presecuencia:
 ttattccga actgatcgga ctgttcagc gtacacgtgt tagtatcct gcgtgttca 60
 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 60
 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 6
 30 Descripción de Secuencia:
Secuencia
 <213> Nombre de Organismo: S. aureaus
 <400> Cadena de presecuencia:
 gctatttgt aatgacaatg taatgagttt agtaaaaa 38
 35 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 38

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 7

Descripción de Secuencia :

Secuencia

<213> Nombre de Organismo : S. aureus

5 <400> Cadena de PreSecuencia :

attacaaatt tgtaacagac ttatTTTA 28

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 28

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 8

10 Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: M. smegmatis str MC2 155

<400> Cadena de presecuencia:

caccagccga aaaggccacg gacccgcagt cacccggatc cgtggccatt tttgtcgac cccccgagaa atctggtcgc aggatccatc agctcagaca gatcac	60
	106

15 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 106

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 9

Descripción de Secuencia:

Secuencia

20 <213> Nombre de Organismo: E. coli K12

<400> Cadena de presecuencia:

agtaaGtttC gaatgcacaa tagcgtacac ttgtacGCCG aacaAGTCCG atcAGCCATT taa	60
	63

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 63

25 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 10

Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: S. aureus

<400> Cadena de presecuencia:

30 gctatttgt aatgacaatg taatgagttt agtaaaaa 38

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 38

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 11

Descripción de Secuencia:

LISTADO DE SECUENCIAS

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: S. aureus

<400> Cadena de presecuencia:

attacaatt tgtaacagac ttatTTA 28

5 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 28

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 12

Descripción de Secuencia:

Secuencia

10 <213> Nombre de Organismo: S. aureus

<400> Cadena de presecuencia:

ttattatata cccatcgaaa taattctaa tcttc 35

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 35

15 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 13

Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: K. pneumoniae

<400> Cadena de presecuencia:

20 ccgataaggg cgcacggttt gcatggttat 30

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 30

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 14

Descripción de Secuencia:

25 Secuencia

<213> Nombre de Organismo: S. aureus

<400> Cadena de presecuencia:

actacaagta ctattagtaa tagttAACCC tt 32

<212> Tipo: ADN

30 <211> Longitud: 32

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 15

Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: E. coli

35 <400> Cadena de presecuencia:

gataatgata atcattatc 19

<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 19
Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 16
Descripción de Secuencia:
5 Secuencia
<213> Nombre de Organismo: H. pylori
<400> Cadena de presecuencia:
gttgtccat aattatagca taaatgataa tgaaaaagta aa 42
<212> Tipo: ADN
10 <211> Longitud: 42
Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 17
Descripción de Secuencia:
Secuencia
<213> Nombre de Organismo: C. difficile
15 <400> Cadena de presecuencia:
aagtttacaa aattatatta gaataactt ttatt 36
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 36
Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 18
20 Descripción de Secuencia:
Secuencia
<213> Nombre de Organismo: P. aeruginosa
<400> Cadena de presecuencia:
aaatgtgatc tagatcacat tt 22
25 <212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 22
Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 19
Descripción de Secuencia:
Secuencia
30 <213> Nombre de Organismo: P.aeruginosa
<400> Cadena de presecuencia:
cactctgcaa tccagttcat aaatcc 26
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 26
35 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 20
Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: P. aeruginosa

<400> Cadena de presecuencia:

gtaacagcg aaccactgca cag 23

5 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 23

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 21

Descripción de Secuencia:

Secuencia

10 <213> Nombre de Organismo: K. pneumoniae

<400> Cadena de presecuencia:

gctttgcact accgcggccc atccctgccc caaaacgatc gct 43

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 43

15 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 22

Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: H. pylori

<400> Cadena de presecuencia:

20 ataatcataa tgattaaagt tttcatattc attataaattc cgtttacaca attatt 56

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 56

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 23

Descripción de Secuencia:

25 Secuencia

<213> Nombre de Organismo: H. pylori

<400> Cadena de presecuencia:

gaaattgttc tatttattat ccatttgctt attaataatt ggttgttaat tttggtttag 60
a 61

<212> Tipo: ADN

30 <211> Longitud: 61

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 24

Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: S. aureus

35 <400> Cadena de presecuencia:

tgaacacctt cttttta 17
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 17
Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 25

5 Descripción de Secuencia:
Secuencia
<213> Nombre de Organismo: S. aureus
<400> Cadena de presecuencia:
agaaaagacaa acaggagtaa 20

10 <212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 20
Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 26

Descripción de Secuencia:
Secuencia
<213> Nombre de Organismo: S. aureus
<400> Cadena de presecuencia:
gaagaaaacaa aaaggcagcat 20

<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 20

20 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 27
Descripción de Secuencia:
Secuencia
<213> Nombre de Organismo: S. aureus
<400> Cadena de presecuencia:
gaagattaga aattattcg atgggtataat aataa 35

<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 35
Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 28

Descripción de Secuencia:
30 Secuencia
<213> Nombre de Organismo: S. aureus
<400> Cadena de presecuencia:
tattatatac ccatcgaaat aatttctaat ctca 35

<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 35
Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 29

Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: S. aureus

<400> Cadena de presecuencia:

5 actacaagta ctattagta tagttaaccc ta 32

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 32

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 30

Descripción de Secuencia :

10 Secuencia

<213> Nombre de Organismo : S. aureus

<400> Cadena de PreSecuencia :

agggttaact attactaata gtacttgtag ta 32

<212> Tipo: ADN

15 <211> Longitud: 32

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 31

Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: S. aureus

20 <400> Cadena de presecuencia:

attacaatt tgaacagac ttattta 28

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 28

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 32

25 Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: S. aureus

<400> Cadena de presecuencia:

aaaataagtc tgttacaaat ttgtaata 28

30 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 28

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 33

Descripción de Secuencia:

Secuencia

35 <213> Nombre de Organismo:

<400> Cadena de presecuencia:

tggccacgga tccgggtgac tgcgggtccg ta	32	
<212> Tipo: ADN		
<211> Longitud: 32		
Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 34		
5	Descripción de Secuencia:	
	<u>Secuencia</u>	
<213> Nombre de Organismo:		
<400> Cadena de presecuencia:		
	acggacccgc agtcacccgg atccgtggcc aa	32
10	<212> Tipo: ADN	
<211> Longitud: 32		
Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 35		
Descripción de Secuencia:		
	<u>Secuencia</u>	
15	<213> Nombre de Organismo:	
<400> Cadena de presecuencia:		
	acggcttgc tgtcaattat a	21
<212> Tipo: ADN		
<211> Longitud: 21		
20	Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 36	
Descripción de Secuencia:		
	<u>Secuencia</u>	
<213> Nombre de Organismo:		
<400> Cadena de presecuencia:		
25	tacacatatg ttcttcctaataa	24
<212> Tipo: ADN		
<211> Longitud: 24		
Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 37		
Descripción de Secuencia:		
30	<u>Secuencia</u>	
<213> Nombre de Organismo: S. aureus		
<400> Cadena de presecuencia:		
	cgtcaatcat tggcctaac ggctgc	26
<212> Tipo: ADN		
35	<211> Longitud: 26	
Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 38		

Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: S. aureus

<400> Cadena de presecuencia:

5 gccatctgct acttcaggtg attgagg 27

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 27

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 39

Descripción de Secuencia:

10 Secuencia

<213> Nombre de Organismo: S. aureus

<400> Cadena de presecuencia:

cttgggtttt ccaaggaaaga ttagaaatata ttgcgtatggg tatataata 49

<212> Tipo: ADN

15 <211> Longitud: 49

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 40

Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: S. aureus

20 <400> Cadena de presecuencia:

ccgtctttt gacggattata tatacccatc gaaataattt ctaatcttc 49

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 49

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 41

25 Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: S. aureus

<400> Cadena de presecuencia:

cttgggtttt ccaagttagaa agaagattt gggcgatttt ataatatat 49

30 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 49

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 42

Descripción de Secuencia:

Secuencia

35 <213> Nombre de Organismo: S. aureus

<400> Cadena de presecuencia:

ccgtctttt gacggatata ttataaaatc gccctaaatc ttctttcta 49
 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 49
 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 43

5 Descripción de Secuencia:
Secuencia
<213> Nombre de Organismo: S. aureus
<400> Cadena de presecuencia:
cttggttttt ccaagtaatg aatgagttt aagccatgt aaaagggtt atcgtac 57
10 <212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 57
Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 44
Descripción de Secuencia:
Secuencia
15 <213> Nombre de Organismo: S. aureus
<400> Cadena de presecuencia:
ccctctttt gaggggtact gataccctt ttacatggc tttaaactca ttcatta 57
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 57
20 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 45
Descripción de Secuencia:
Secuencia
<213> Nombre de Organismo: S. aureus
<400> Cadena de presecuencia:
25 ctgggtttt ccaaggtaat atgacaagat tgtaaatgac ctgttgaga gatgcca 57
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 57
Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 46
Descripción de Secuencia:
30 Secuencia
<213> Nombre de Organismo: S. aureus
<400> Cadena de presecuencia:
ccctctttt gagggggca tctctcaact aggtcattt caatcttgtc atattac 57
<212> Tipo: ADN
35 <211> Longitud: 57
Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 47

Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: S. aureus

<400> Cadena de presecuencia:

5 ctgggtttt ccaagtaatg aatgagttt aagccatgt aaaagggtt tcagttac 57

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 57

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 48

Descripción de Secuencia:

10 Secuencia

<213> Nombre de Organismo: S. aureus

<400> Cadena de presecuencia:

ccctctttt gaggggtact gataccctt ttacatggc tttaaactca ttcatta 57

<212> Tipo: ADN

15 <211> Longitud: 57

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 49

Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo:

20 <400> Cadena de presecuencia:

tcttaaatg gctgatcgaa ctgg 24

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 24

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 50

25 Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: S. aureus

<400> Cadena de presecuencia:

agtaagttc gaatgcacaa tagcgta 27

30 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 27

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 51

Descripción de Secuencia:

Secuencia

35 <213> Nombre de Organismo: M. smegmatis

<400> Cadena de presecuencia:

caccagccga aaaggccacg g 21
 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 21
 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 52

5 Descripción de Secuencia:
Secuencia
 <213> Nombre de Organismo: M. smegmatis
 <400> Cadena de presecuencia:
 caaaaatggc cacggatccg ggtg 24

10 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 24
 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 53
 Descripción de Secuencia:
Secuencia
 <213> Nombre de Organismo: K. pneumoniae
 <400> Cadena de presecuencia:
 ccgataaggg cgcacggttt gcatggttat a 31
 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 31

20 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 54
 Descripción de Secuencia:
Secuencia
 <213> Nombre de Organismo: K. pneumoniae
 <400> Cadena de presecuencia:
 ataaccatgc aaaccgtgog cccttatcg a 31
 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 31
 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 55
 Descripción de Secuencia:
Secuencia
 <213> Nombre de Organismo:
 <400> Cadena de presecuencia:
 IKFLKFLKKL R 11
 <212> Tipo: PRT

35 <211> Longitud: 11
 Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 56

Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: Bacteria

<400> Cadena de presecuencia:

5 tgtwawnnnn ntgtaarv 17

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 17

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 57

Descripción de Secuencia:

10 Secuencia

<213> Nombre de Organismo: Bacteria

<400> Cadena de presecuencia:

gkttwannnn nnnnnnnnnn kggtaw 26

<212> Tipo: ADN

15 <211> Longitud: 26

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 58

Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: K. pneumoniae

20 <400> Cadena de presecuencia:

tggcacagat ttcgtc 16

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 16

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 59

25 Descripción de Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de Organismo: K. pneumoniae

<400> Cadena de presecuencia:

tggnnnnnnw ttgcw 16

30 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 16

Nombre de Secuencia: SEQ ID NO: 60

Descripción de Secuencia:

REIVINDICACIONES

1. Un método no terapéutico para reducir la viabilidad de células procariotas, comprendiendo el método:
 - (a) proporcionar un polinucleótido señuelo que comprende un sitio de unión para un factor de transcripción diana (una secuencia señuelo);
 - 5 (b) introducir el polinucleótido señuelo en una célula procariota que comprende un sitio de unión para el factor de transcripción, unido operativamente a un gen o genes;en el que la introducción del polinucleótido señuelo reduce la unión del factor de transcripción diana al sitio de unión en la célula y causa una alteración en la expresión del gen o genes unidos operativamente;
- 10 y en el que el factor de transcripción diana comprende un regulador de la expresión de un gen o genes que codifican uno o más de:
 - (i) una respuesta celular adaptativa;
 - (ii) un mecanismo celular intrínseco de resistencia a antibióticos;
 - (iii) un factor celular de virulencia;
 - (iv) una respuesta celular a estrés; o
 - 15 (v) un gen celular esencial.
2. Un método no terapéutico para incrementar la susceptibilidad procariota a antibióticos, comprendiendo el método:
 - (a) proporcionar un polinucleótido señuelo que comprende un sitio de unión para un factor de transcripción diana (una secuencia señuelo);
 - 20 (b) introducir el polinucleótido señuelo en una célula procariota que comprende un sitio de unión para el factor de transcripción, unido operativamente a un gen o genes;en el que la introducción del polinucleótido señuelo reduce la unión del factor de transcripción diana al sitio de unión en la célula y causa una alteración en la expresión del gen o genes unidos operativamente, incrementando de esta manera la susceptibilidad a antibióticos de la célula;
- 25 y en el que el factor de transcripción diana comprende un regulador de la expresión de un gen o genes que codifican uno o más de:
 - (i) una respuesta celular adaptativa;
 - (ii) un mecanismo celular intrínseco de resistencia a antibióticos;
 - (iii) un factor celular de virulencia;
 - (iv) un gen celular esencial.
- 30 3. Un método según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la reducción de la viabilidad comprende uno o más de:
 - (i) inhibir una respuesta celular adaptativa tal como una respuesta al estrés;
 - (ii) incrementar la susceptibilidad celular a antibióticos;
 - (iii) inhibir la expresión de uno o más genes esenciales;
 - 35 (iv) inhibir la expresión de uno o más genes de virulencia.
4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el factor de transcripción diana se selecciona de: WhiB7; FadR; YycG/YycF; Sigma 54 (o SigA); Fur; TcdR; Vfr; NtrC; ArsR; TcaA; AgrA; WalR; sigB; Ksig; fhu; o una variante u homólogo funcional de cualquiera de éstos.
5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el procariota es una bacteria.
- 40 6. Un método según la reivindicación 5, en el que la bacteria es patogénica.
7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el sitio de unión del factor de transcripción en el polinucleótido señuelo no está unido operativamente a un gen.

8. Un polinucleótido señuelo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en el tratamiento de infección bacteriana.
- 5 9. Un polinucleótido señuelo según la reivindicación 8 para uso en el tratamiento de infección bacteriana, en el que el tratamiento de la infección bacteriana comprende el uso de uno o más antibióticos y/o otro(s) agente(s) antibacteriano(s).
- 10 10. Un polinucleótido señuelo según la reivindicación 8 o reivindicación 9 para uso en el tratamiento de infección bacteriana, en el que el tratamiento de la infección bacteriana comprende tratar una afección seleccionada de: neumonia, bacteremia, tosferina, enfermedad de lyme, brucelosis, enteritis aguda, septicemia, tularemia, gripe, úlceras pépticas, enfermedad del Legionario, gonorrea, infecciones nosocomiales, sepsis, rickettsiosis, tifus, disentería, cólera, peste, ántrax, colitis pseudomembranosa, difteria, listeriosis, tuberculosis, septicemia, meningitis.
11. Un método *ex vivo* para matar bacterias, inhibir el crecimiento bacteriano, o reducir la virulencia bacteriana, comprendiendo el método aplicar un polinucleótido señuelo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, opcionalmente en combinación con uno o más antibióticos y/o agentes antibacterianos.
12. Uso de señuelos de factores de transcripción (TFD) para reducir la viabilidad de células procariotas *ex vivo*.
- 15 13. Uso de señuelos de factores de transcripción (TFD) para reducir la virulencia de células procariotas *ex vivo*.

FIGURA 1
Tabla 1. Resistencia mediada por eflujo a antimicrobianos no-fluoroquinolona

Antimicrobiano	Sistema de eflujo	Familia de bombas	Localización génica	Organismo(s)	Referencia ^a
Cloranfenicol y florfenicol Cloranfenicol	Cml, CmlA, CmlB Cml, Cmlv, Cmr, Cmx, CmrA	MF ?	mayoría plásmido; algunos cromosoma	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E.</i> <i>aerogenes</i> , <i>K.</i> <i>pneumonia</i> , <i>S. enterica</i> serovar, <i>Typhimurium</i>	48
MdfA^b	MdfA ^b MexEF-OprN ^c , variedad de bombas RND de tres componentes ^d	MF RND	plásmido y cromosoma	Streptomyces spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Rhodococcus</i> spp.	48
OqxAB	OqxAB Flo, FloR, pp-Flo	RND MF	cromosoma	<i>E. coli</i>	74
Cloranfenicol, florfenicol	Flo, FloR, pp-Flo	MF	plásmido y cromosoma	<i>P. aeruginosa</i> , varias bacterias Gram- negativas	74, 79
FexA	FexA	?	plásmido	<i>E. coli</i>	84
Macrólidos, lincosamidas, estreptograminas y quetólicos Macrólidos	Mef(A)	MF	cromosoma	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	48
			plásmido	<i>S. lentus</i>	70
			cromosoma	Streptococcus spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp., <i>Neisseria</i> spp., varios Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae comensales	146, 176
Macrólidos, tipo B	Msr(A)	ABC	plásmido	<i>Staphylococcus</i> spp.	173, 175
Estreptograminas	Msr(C)	ABC	cromosoma	<i>E. faecium</i>	146, 180
Macrólidos, quelótidos	Msr(D)	ABC	cromosoma	<i>S. pneumoniae</i>	149
Macrólidos, lincosamidas, estreptograminas tipo A	MdeA	MF	cromosoma	<i>S. aureus</i> , <i>S.</i> <i>hemolyticus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i>	192
Estreptograminas tipo A	Vga(A/B)	ABC	plásmido	<i>S. aureus</i>	173
Lincosamidas, estreptograminas	Lsa	ABC	cromosoma	<i>E. faecalis</i>	173, 186
Clindamicina	Lsa(B)	ABC	plásmido	<i>S. sciuri</i>	187
Lincosamidas	LmrB	MF	cromosoma ^e	<i>B. subtilis</i>	189, 190

Tabla 1. (continuación)

Lincosamidas	LmrB	MF	cromosoma	C. glutamicum	191
Eritromicina	Cme	MF	cromosoma	C. difficile	172
Macrólidos,	? ^a	?		S. pyogenes	188
lincosamidas, estreptograminas tipo B					
Macrólidos	MacAB-TolC	ABC	cromosoma	E. coli	521
Macrólidos	MtrCDE	RND	cromosoma	N. gonorrhoeae	168, 197, 198
Macrólidos, lincosamidas, quetolídos	AcrAB-TolC, Mex ^y , bombas RND en varias bacterias Gram- negativas ^b	RND	cromosoma	E. coli, E. aerogenes, P. aeruginosa; otras bacterias Gram- negativas	74, 195, 196
Eritromicina	MdfA _{III}	MF	cromosoma	E. coli	74
Eritromicina	?	?	?	Campylobacter spp.	202, 480
Eritromicina, roxitromicina	MexCD-OprJ	RND	plásmido	Pseudomonas spp.	201
Tetraciclinas y glicilciclinas tetraciclinas	Tet(A), Tet(B), Tet(C), Tet(D), Tet(E), Tet(G), Tet(H), Tet(J), Tet(Y), Tet(Z), Tet(30), Tet(39) Tet(K), Tet(L)	MF	plásmido	Bacterias Gram- negativas	47, 96, 522
	Tet38	MF	plásmido	Bacterias Gram-positivas	47, 522
	Tet(V)	MF	plásmido	S. aureus	94
	Rv1258/Tap	MF	cromosoma	M. tuberculosis, M. fortuitum	95
	P55/Rv1410	MF	cromosoma	M. tuberculosis, M. bovis	129, 130
	MdfA _{III}	MF	cromosoma	E. coli	131
	MexAB-OprM ^t , varias bombas de tres componentes de la familia RND				74
Gliciciclinas	AcrAB-TolC, MexYY- OprM, MexAB-OprM, MexCD-OprJ	RND	cromosoma	P. mirabilis, E. coli, K. pneumoniae, M. morganii, P. aeruginosa	460-464a
β-Lactamas	MepA	MATE	cromosoma	S. aureus	464a
	AcrAB-TolC ^j	RND	cromosoma	H. influenzae	331
	MexAB-OprM ^k ; varias bombas de tres componentes de la familia RND	RND	cromosoma	P. aeruginosa; varias bacterias Gram- negativas	74, 250

Tabla 1. (continuación)

Aminoglicósidos	LmrA ^m	ABC	cromosoma	L. lacticis	85
AcrAD-TolC	RND	cromosoma	E. coli	74, 523	
BpeAB-OprB	RND	cromosoma	B. pseudomallei	292	
AmrAB-OprA	RND	cromosoma	B. pseudomallei	524	
MexXY-OprM	RND	cromosoma	P. aeruginosa	74, 306, 307	
MexAB-OprM ⁿ	RND	cromosoma	P. aeruginosa	74	
EmrE ⁿ	RND	cromosoma	P. aeruginosa	74	
MdfA ^m	MF	cromosoma	P. aeruginosa	74	
LmrA ^m	ABC	cromosoma	E. coli	74	
Oxazolidinonas	AcrAB-TolC, AcreF-TolC	RND	cromosoma	L. lacticis	85
			E. coli	196	

^a Cuando los sistemas de eflujo se han descrito en artículos de revisión previos, éstos se resaltan aquí, de otra manera se citan los artículos originales.^b Este sistema de eflujo multífármaco se identificó originalmente como el exportador de cloranfenicol Cmr/CmlA.^c Las cepas mutantes de *P. aeruginosa* que sobreexpresan MexEF-OprN se seleccionan fácilmente in vitro usando cloranfenicol. 78-80^d Cuando se ensayan, los sistemas de eflujo de tipo RND que estimulan la resistencia a cloranfenicol también estimulan resistencia a florfenicol (por ejemplo, AcrAB-TolC75 y AcrEF-TolC86 en *S. enterica* serovar Typhimurium).^e El eflujo se ha demostrado aunque no se ha identificado un sistema de eflujo.^f El o los genes de eflujo no se han identificado aunque se ha confirmado su movilidad.^g Las cepas mutantes de *P. aeruginosa* que sobreexpresan MexCD-OprJ pueden seleccionarse in vitro usando eritromicina (Poole, resultados no publicados).^h La exportación de macrólidos, lícosamidas y estreptograminas por los sistemas de eflujo multífármaco de tipo RND de tres componentes puede explicar la ausencia de susceptibilidad de muchas bacterias Gram-negativas a estos agentes.ⁱ Las cepas mutantes de *P. aeruginosa* que sobreexpresan MexAB-OprM pueden seleccionarse in vitro usando tetraciclina. 78, 132, 133^j Asociado con resistencia a ampicilina en cepas clínicas. 331^k Implicado en resistencia a meropenem322 y ticarcilina323, 324 en aislados clínicos.^l Aunque los sistemas de eflujo de tipo RND manacomodan b-lactamas (véase el texto), pocos están implicados como determinantes primarios de resistencia, en aislados de laboratorio o clínica.^m El gen clonado estimula incrementos muy modestos en MIC al antimicrobiano indicado.ⁿ Muestra una contribución modesta a la resistencia intrínseca a aminoglicósido pero sólo observada en medios con baja fuerza iónica.

Tabla 2. Resistencia mediada por esfírujo a fluoroquinolonas^a

Sistema de esfírujo	Familia de bombas	Antimicrobiano ^b	Organismo(s)	Referencia
Gram-positivas				
NorA	MF	NOR, CIP	<i>S. aureus</i>	209, 525
NorB	MF	NOR, CIP, MOX, SPR	<i>S. aureus</i>	94
?	?	NOR, CIP, MOX, GAT, SPR	<i>S. aureus</i>	212
PmrA	MF	NOR, CIP	<i>S. enterotoxice</i>	209, 526
?	?	NOR, CIP, MOX	<i>S. enterotoxice</i>	213
ErmA	MF	NOR, CIP	<i>E. faecalis</i>	235, 235a
Lde	MF	NOR, CIP	<i>L. monocytogenes</i>	233
PstAB	ABC	NOR, CIP	<i>E. faecalis</i>	352
?	?	FQ	<i>B. subtilis</i>	237, 527
Bnr	MF	FQ	<i>B. subtilis</i>	209
Blt	MF	FQ	<i>B. subtilis</i>	209
Bnr3	MF	FQ	<i>B. subtilis</i>	528
M11, M12 ^c	ABC	CIP	<i>M. bovis</i>	240
LsrA	MF	FQ (CIP, NOR)	<i>M. smegmatis</i>	242, 529
EfpA	MF	CIP, NOR	<i>M. smegmatis</i>	242
Rv1634	MF	FQ	<i>M. tuberculosis</i>	129
Rv1258c	MF	OFL	<i>M. tuberculosis</i>	245
Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c ^d	ABC	FQ	<i>M. tuberculosis</i>	243
LsrA	ABC	CIP, OFL	<i>L. lactis</i>	85
Mntz	SMR	CIP, NOR	<i>M. smegmatis</i>	242
Gram-negativas				
AcrAB-TolC, AcrEF-TolC	RND	FQ	<i>E. coli</i>	74
MexAB-OpmM, MexCD-OpmA	RND	FQ	<i>P. aeruginosa</i>	74, 250
MexEF-OpmA, MexXY-OpmA ^e	RND	FQ	Enterobacter spp.	74, 258, 530
AcrAB-TolC	RND	FQ	<i>Klebsiella</i> spp.	74, 76, 263, 531
AcrAB-TolC	RND	FQ	<i>S. enterica</i> (Typhimurium, Enteritidis)	75, 270-272, 532
AcrAB-TolC	RND	FQ	<i>S. enterica</i> serovar Typhiurum	86
SmeABC, SmeDEF	RND	FQ	<i>S. maltophilia</i>	74, 277, 289, 533, 534
CmeABC, CmeDEF	RND	FQ	<i>C. jejuni</i>	74, 256, 257, 535
SdeAB	RND	FQ	<i>S. macroscopus</i>	194, 276, 535b
SdeXY	RND	NOR	<i>S. macroscopus</i>	74
MrcCDE	RND	PQ	<i>N. gonorrhoeae</i>	210, 280
CeoAB-QepM	RND	FQ	<i>B. cereus</i> (cenococcinea)	82
AcrAB	RND	CIP	<i>P. mirabilis</i>	74
AdeABC	RND	PQ	<i>A. baumannii</i>	74
VcaM	ABC	CIP, NOR	<i>V. cholerae</i>	290
Orf12-Orf11-Orf10 (plásmido) ^f	ABC	NAL, NOR	<i>Pseudomonas</i> spp.	193
MefA	MF	FQ	<i>E. coli</i>	210, 291
?	?	FQ	<i>A. salmonicida</i>	255
?	?	FQ	<i>C. freundii</i>	536, 537
?	?	OFL	<i>P. vulgaris</i>	538
?	?	CIP, NOR	<i>B. fragilis</i>	209, 539

^a Excluyendo los exportadores multifármaco de la familia MATE

^b NOR, norfloxacina; CIP, ciprofloxacina; MOX, moxifloxacina; GAT, gatifloxacina; SPR, esparfloxacina; OFL, ofloxacina; NAL, ácido nalidíxico; FQ, fluoroquinolonas.

^c Resistencia mediada por eflujo observada pero el determinante específico no se ha identificado; no NorA.

^d Resistencia mediada por eflujo observada pero el determinante específico no se ha identificado; no PmrA.

5

^e Resistencia mediada por eflujo observada pero el determinante específico no se ha identificado.

^f Sistema de eflujo de tipo ABC asociado a membrana citoplásrica ensamblado a partir de 2 subunidades.

^g Sistema de eflujo de tipo ABC asociado a membrana citoplásrica ensamblado a partir de 3 subunidades.

^h Acomoda fluoroquinolonas aunque no hay indicaciones de fluoroquinolonas que seleccionan mutantes que sobreproducen MexXY in vitro o in vivo.

ⁱ Codifica un componente ABC-MFP de un probable sistema de exportación multifármaco ABC-MFP-OMF.

Figura 2

Experimentos de transfección

Dianas de señuelo

Bacteria	ATCC/Cepa	Clasificación	Indicación	Diana	Descripción
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	MC2 155	Gram-positiva/Actinobacteria/ Pared celular rica en lípidos	Considerado modelo no patogénico para TB	<i>WhiB7</i> consenso (396)	Regulador transcripcional de genes de resistencia a antibióticos
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538NA (cepa de ensayo FDA)	Gram-positiva/Firmicutes/ coccus-bolas doradas	Muchas: TSS/ neumonía/ septicemia	<i>WalR</i> consenso (448)	Controlador principal de la respuesta adaptativa que regula la sensibilidad a antibióticos, particularmente estructura de la pared. También conocido como YYOG consenso
<i>Clostridium difficile</i>	BAA-1362	Gram-positiva/Firmicutes/ bacteria intestinal comensal	-	<i>ctxA</i> , consenso <i>ctxB</i> , consenso	Genes regulados al alza en cepas intermedias de glicopéptido, TFD candidatos identificados por bioinformática Regulador de virulencia, secuencia candidata identificada por bioinformática
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Gram-negativa/ Proteobacteria/anaerobia facultativo	Infección pulmonar en pacientes CF/Modelo tóxico	<i>TcdR</i> consenso (506)	Factor sigma alternativo que se autoregula y dirige la expresión de dos exotoxinas
<i>Escherichia coli</i>	K12	Gram-negativa/ Proteobacteria/anaerobia facultativo	Muchas: neumonía/ septicemia	<i>fadR</i> consenso (511)	Controlador principal de la respuesta adaptativa Regulador de enzimas esenciales requeridas para la síntesis de ácidos grasos
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Gram-positiva/Firmicutes/en nasofaringe	Varias: meningitis Ahora se vacuna	-	Regulador de la captación de hierro
<i>Yersinia pestis</i>	CO92	Gram-Negativo/patógeno oportunitista	-	<i>YopH</i> (160)	Controlador principal de la respuesta adaptativa Regula a la baja un gen esencial, dina
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	CO92	Gram-Negativo/patógeno oportunitista	-	<i>YopH</i> (160)	Controlador principal de la respuesta adaptativa

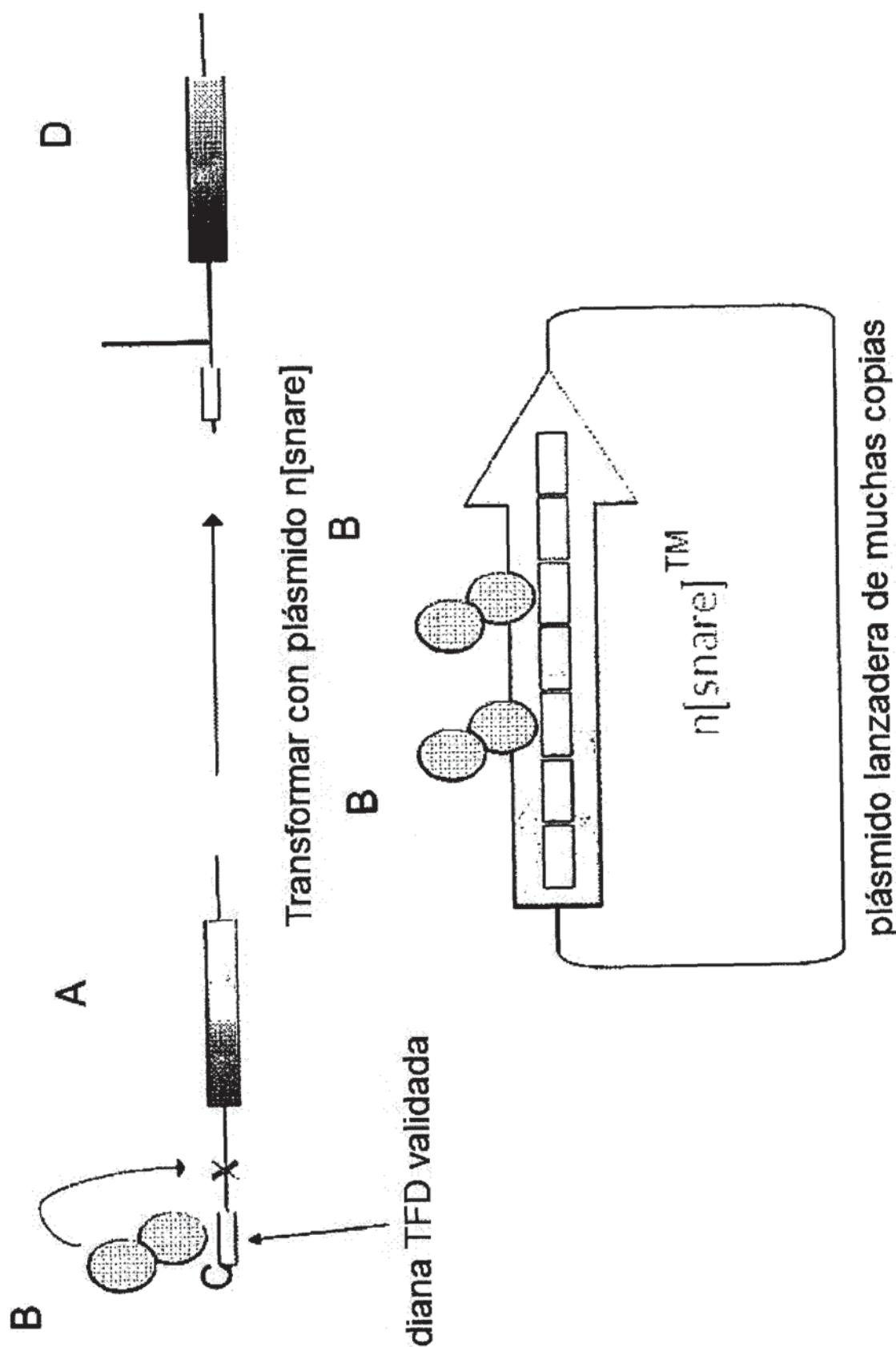
Figura 3

Figura 4

CTTGG TTTT CCAG AGAGAGC: cgg cca tgg egg egg egg gaa tcc NNN NNN TCA CTA GTG AAT TCG CGG CGG CCT GCG TGT CGG
GAACC AAAA GGTTC TGTCTCG ggc ggt acc gcc ggc aag NNN NNN ACT GAT CAC TTA AGC GCC GGC GAA CGTGTACGCC GGC AGT TTT TCT GCC
T CON Nt-BspQI (NEB: R0644L)

CTTGG TTTT CCAG AGAGAGC: cgg cca tgg egg egg egg gaa tcc NNN NNN TCA CTA GTG AAT TCG CGG CGG CCT GCG TGT CGG
TGTCTCG ggc ggt acc gcc ggc aag NNN NNN ACT GAT CAC TTA AGC GCC GGC GAA CGTGTACGCC GGC AGT TTT TCT GCC
E CON ADN POLIMERASA T4

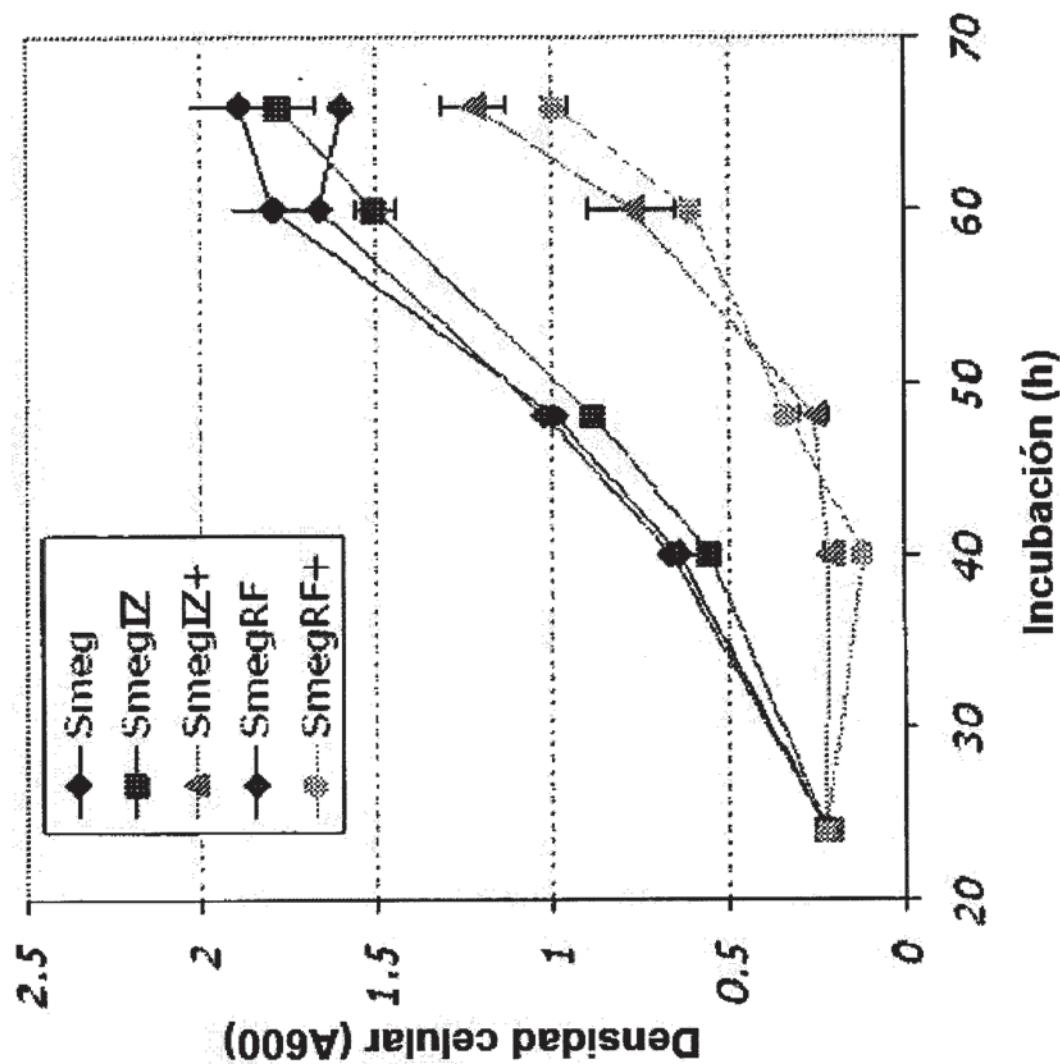
Figura 5

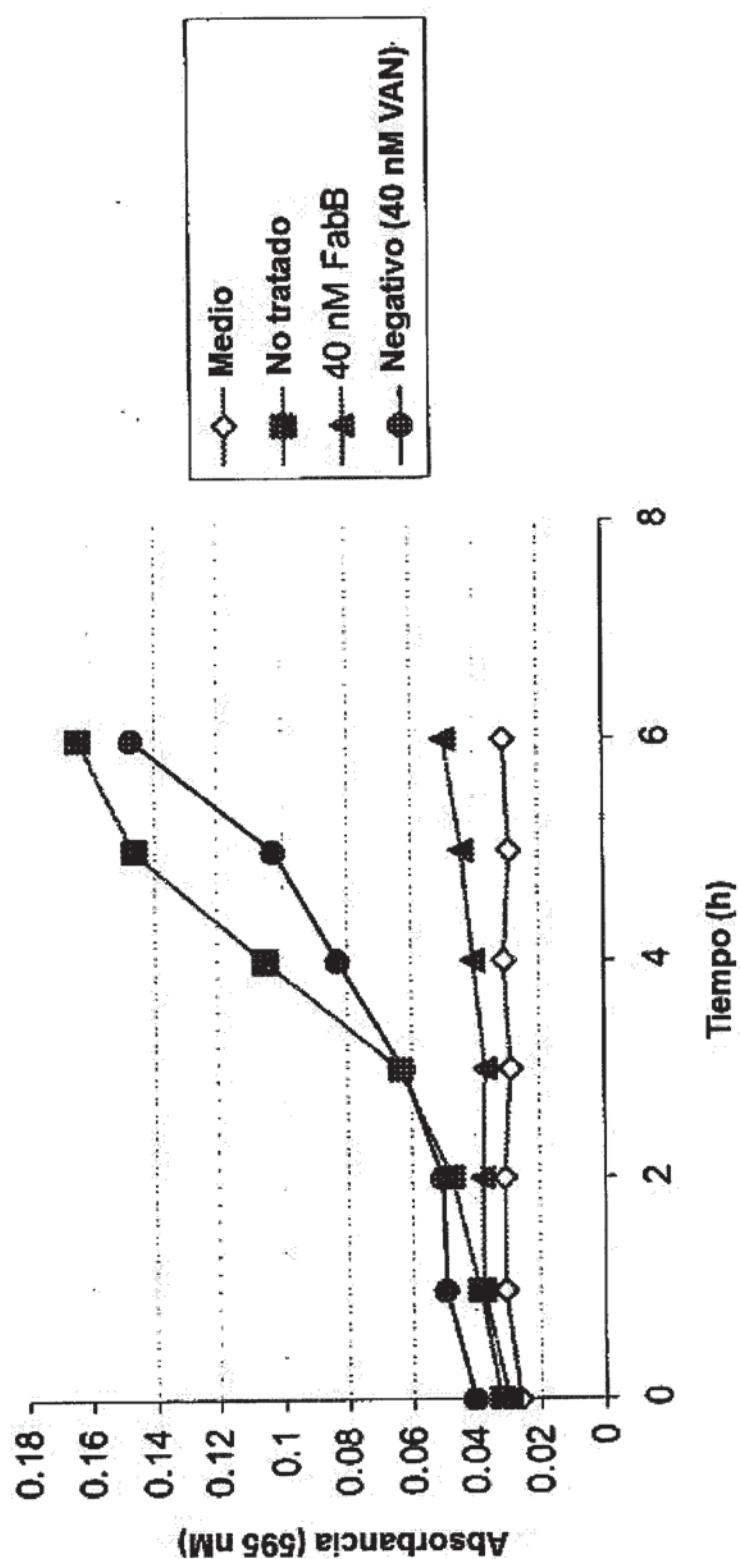
Figura 6

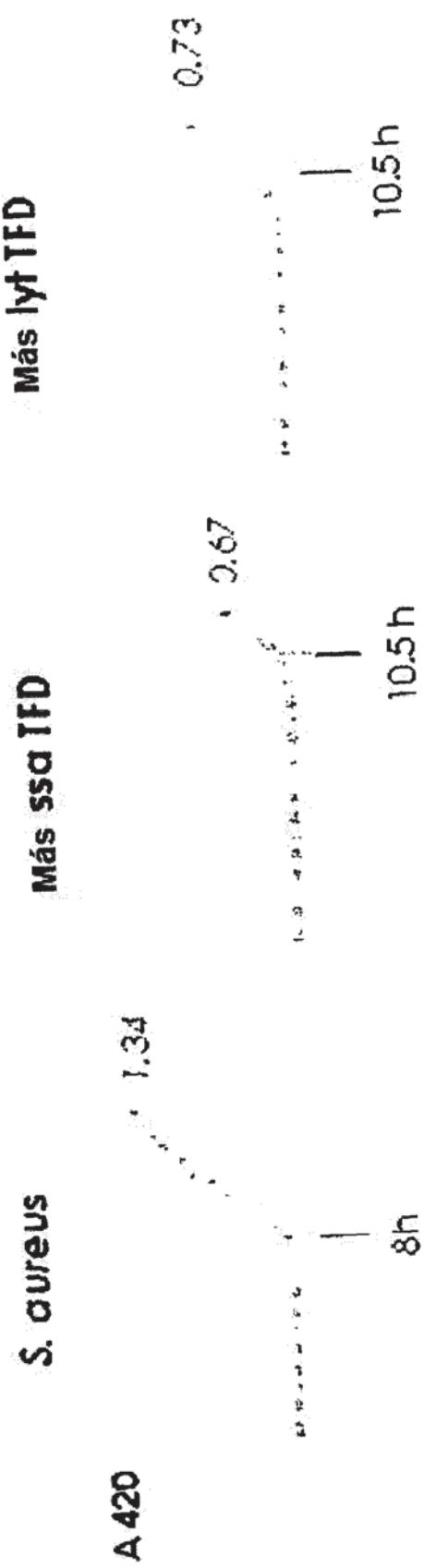
Figura 7

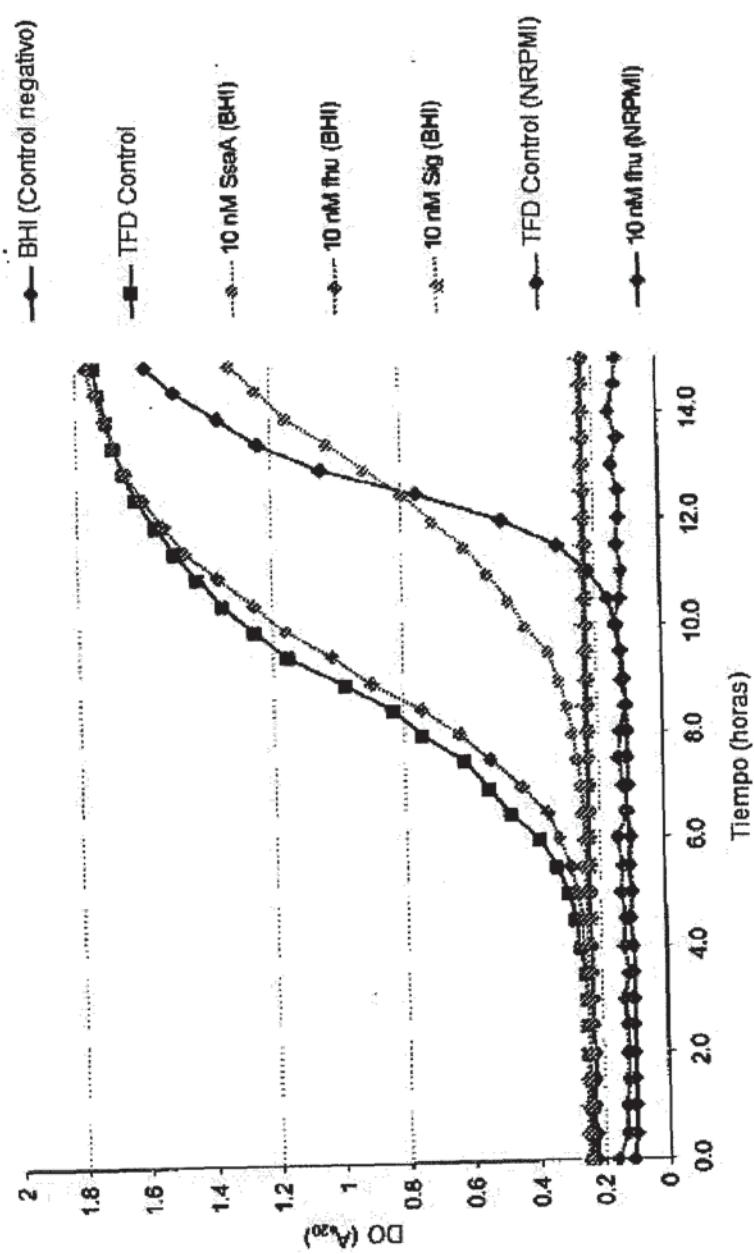
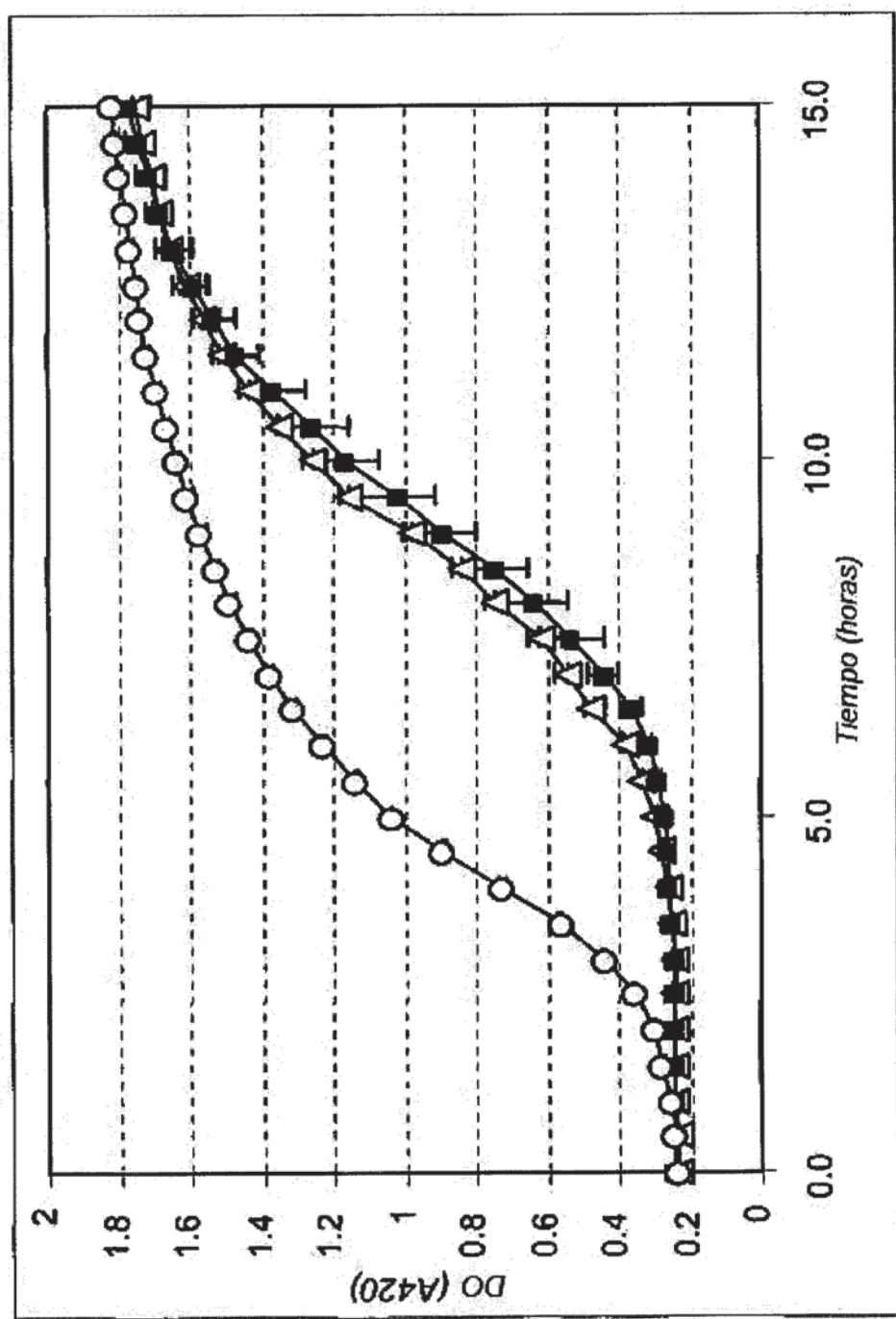
Figura 8

Figura 9

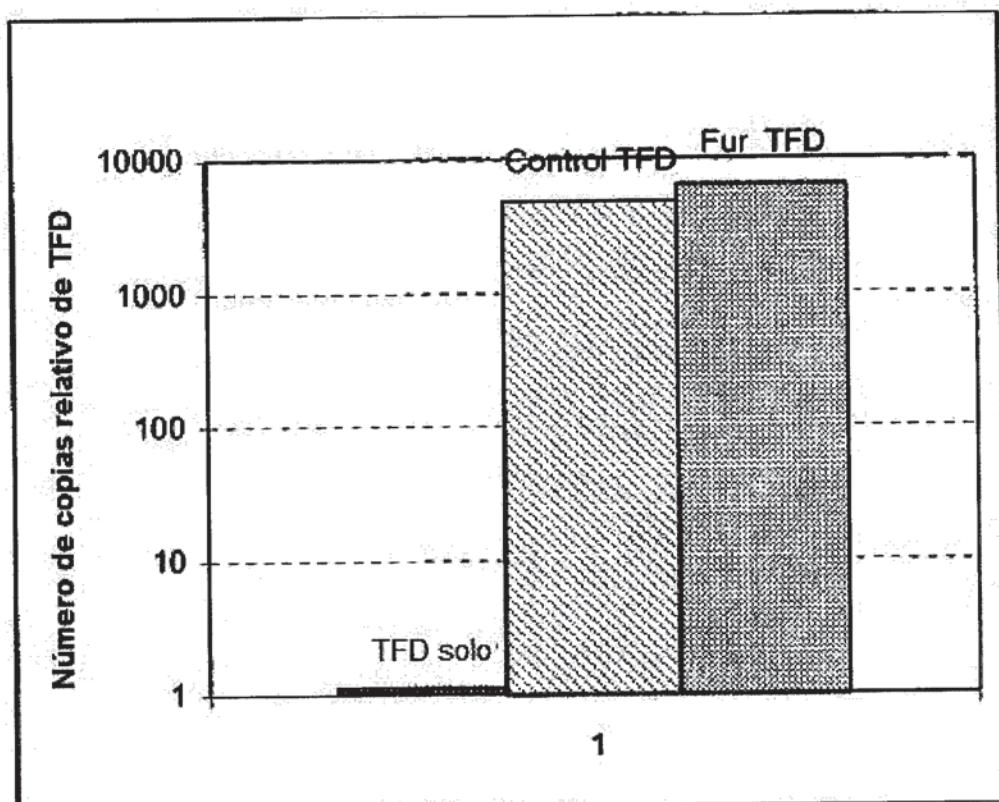
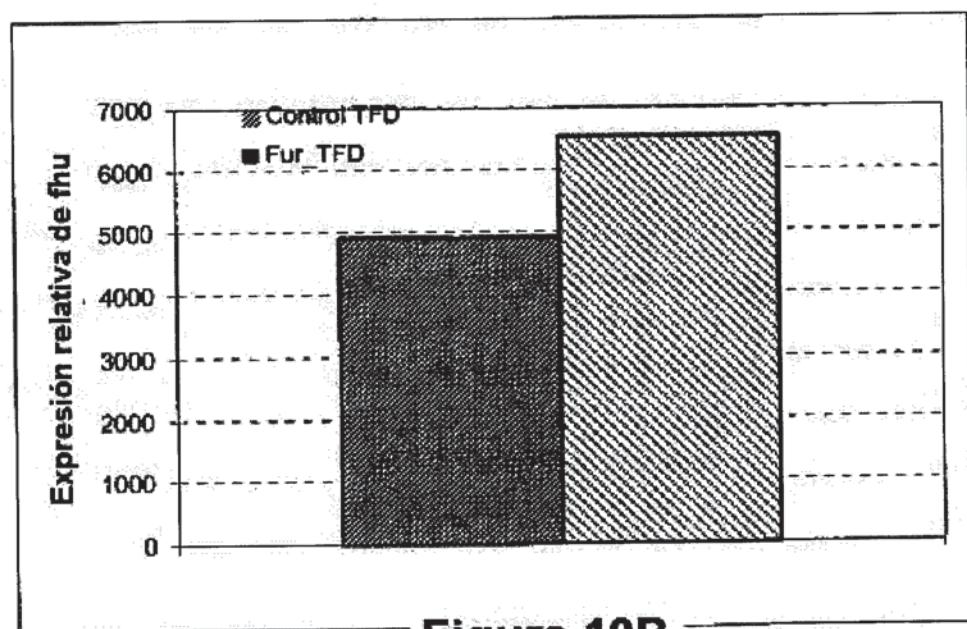
**Figura 10A****Figura 10B**

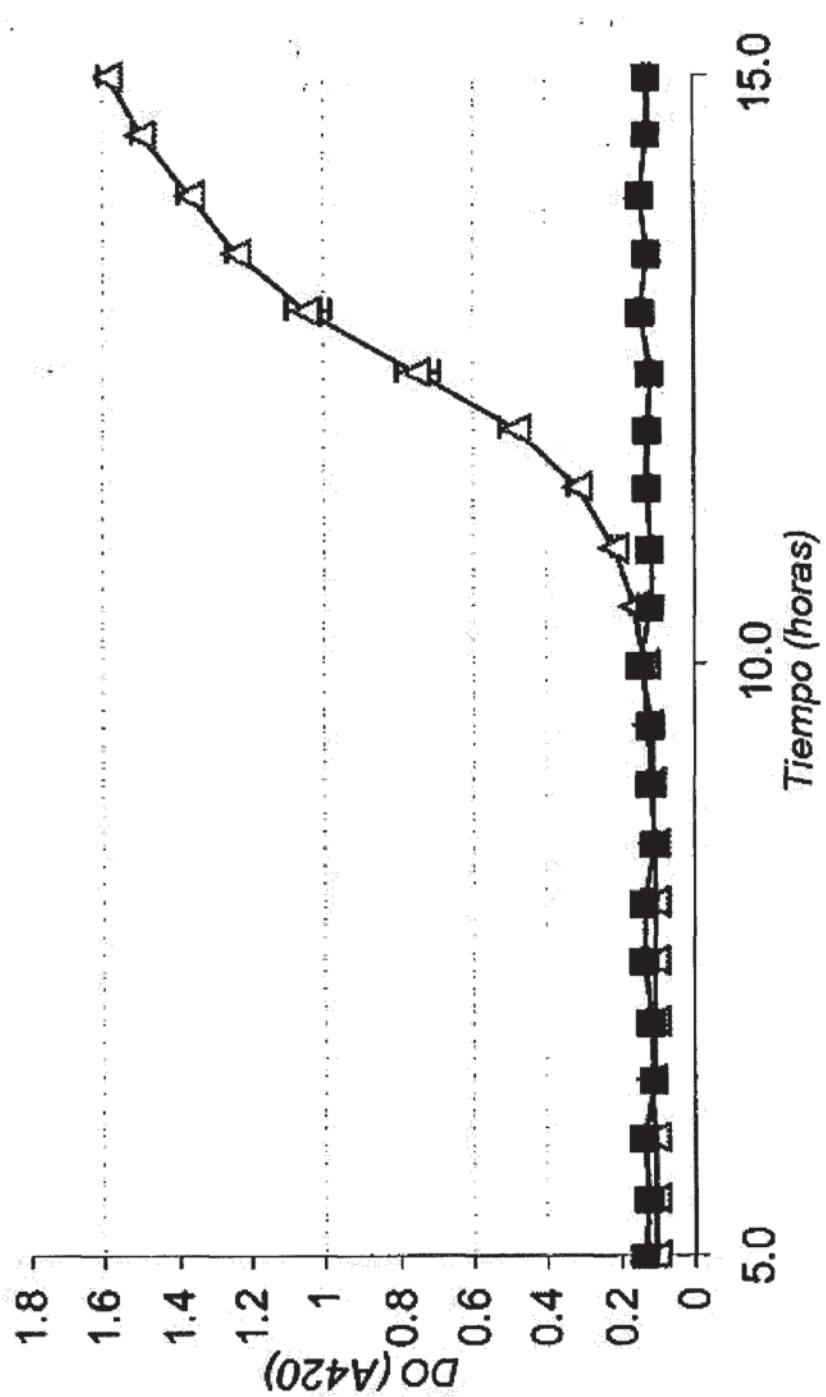
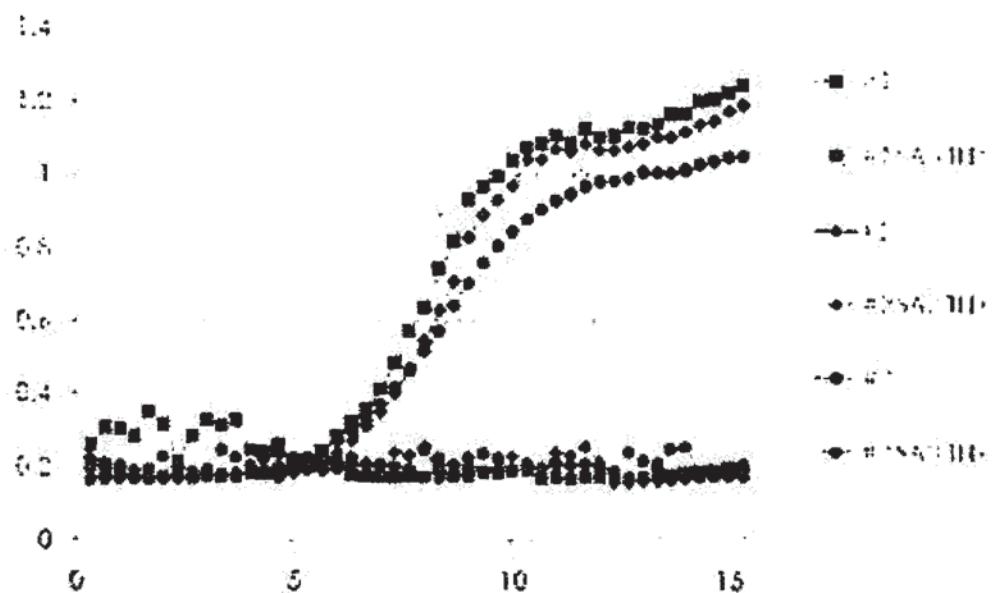
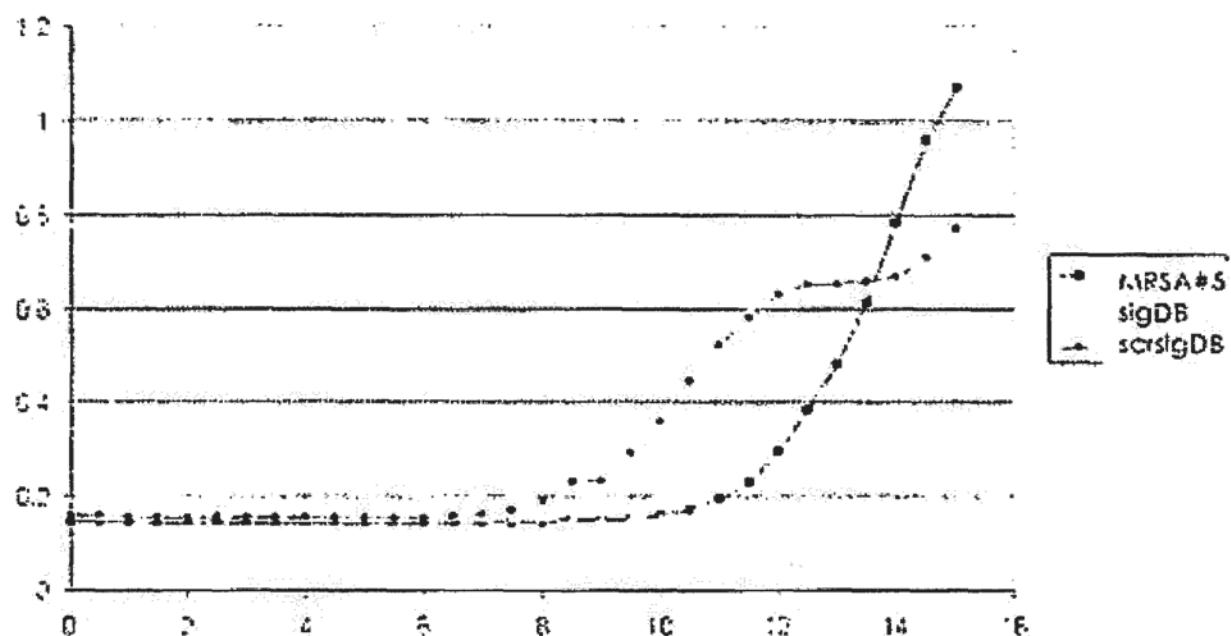
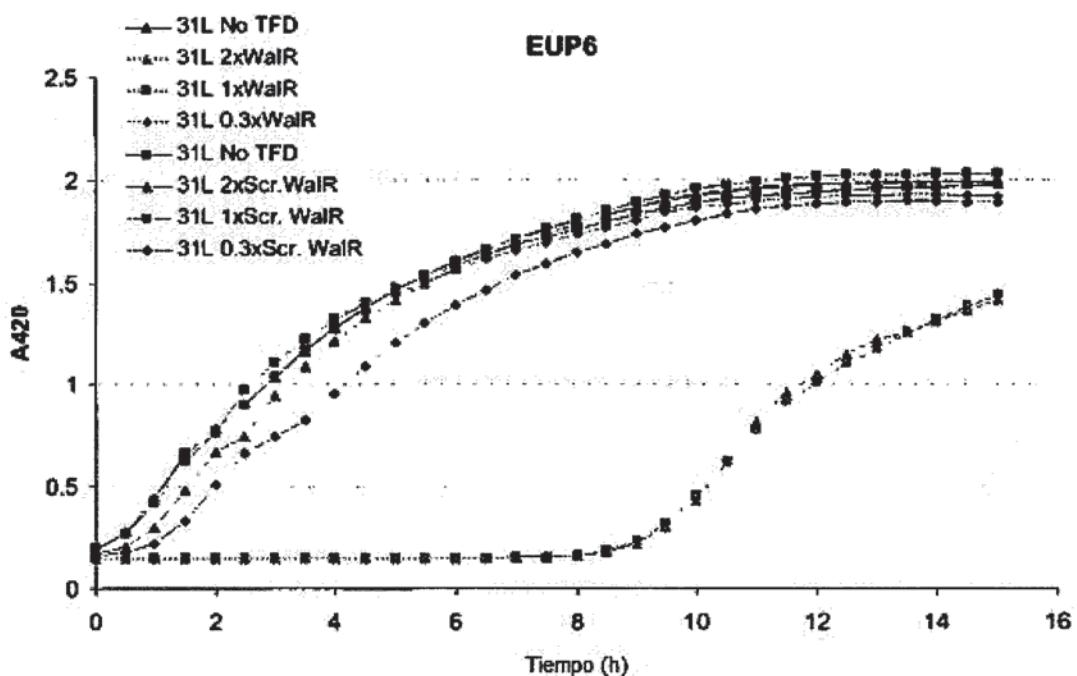
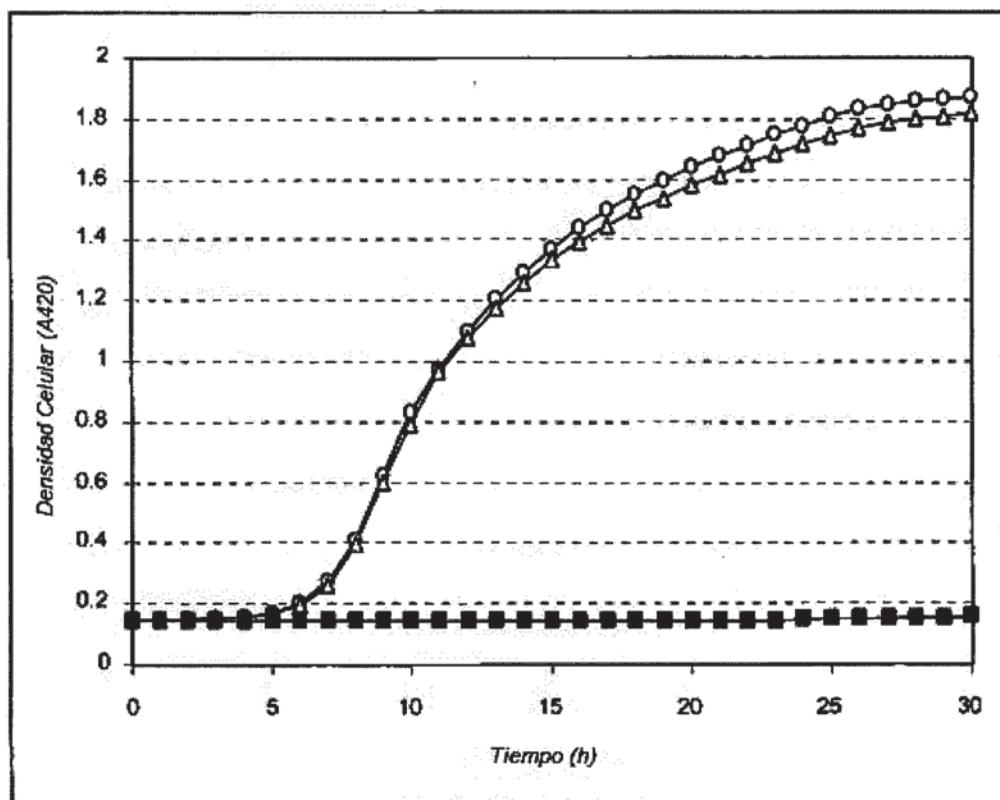
Figura 11

Figura 12

Sample	Sequence
Banthracis_GHAB1093	(1) GAGGTTTCTTC
Banthracis_BA4651	(1) GAGGTTTCTTC
Banthracis_BA51021	(1) GAGGTTTCTTC
Banthracis_GHAA4651	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_ECBR20_1117	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_ECBR20_4500	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_ECB4154_24540	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BCO9862_36645	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BC2242115	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_EACMEC_60329	(1) GAGGTTTCTTC
Banthracis_BA51017	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BC224166	(1) GAGGTTTCTTC
Banthracis_GHAA4652	(1) GAGGTTTCTTC
Leucocytogenes_IMCC_1523	(1) GAGGTTTCTTC
Leucocytogenes_IMCC2365_1116	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_MH0068_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_MH0059_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BB0111_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BB0054c_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BACOL0099_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BAVV_0114_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BA50118_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BA50089_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BauvJBL_0106_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BAUHA300_0117_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BAUVD115_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_USA300EDQ_0126_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BCC9042_93605	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BCO_4208	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_SAB0588_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BACMEC_00745_A	(1) GAGGTTTCTTC
Leucocytogenes_IMCC_0596_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BF00323_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BauvJBL_0395_A	(1) GAGGTTTCTTC
Leucocytogenes_IMCC2365_1990_A	(1) GAGGTTTCTTC
Leucocytogenes_lmo1960_A	(1) GAGGTTTCTTC
Banthracis_BA51231_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BC5383_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_ECAM147_AS551_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BCH4284_AS504_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BCE_5512_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BCG9342_BS5449_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BCO_5223_A	(1) GAGGTTTCTTC
Leucocytogenes_IMCC_1524_A	(1) GAGGTTTCTTC
Leucocytogenes_IMCC_0597_A	(1) GAGGTTTCTTC
Leucocytogenes_lmo1959_A	(1) GAGGTTTCTTC
Leucocytogenes_IMCC2365_1987_A	(1) GAGGTTTCTTC
Leucocytogenes_lmo0184	(1) GAGGTTTCTTC
Leucocytogenes_lmo1131	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BAUH0093_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BAUH0060_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BB0112_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BACOL0100_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BAVV_0113_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BA50119_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BB0090_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BauvJBL_0187_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BAUH00103_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BAUHA300_0118_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_BAUVD116_A	(1) GAGGTTTCTTC
Bacillus_USA300EDQ_0127_A	(1) GAGGTTTCTTC
Complementary	(1) TGATAAT ATTATC

**Figura 13****Figura 14**

**Figura 15****Figura 16**

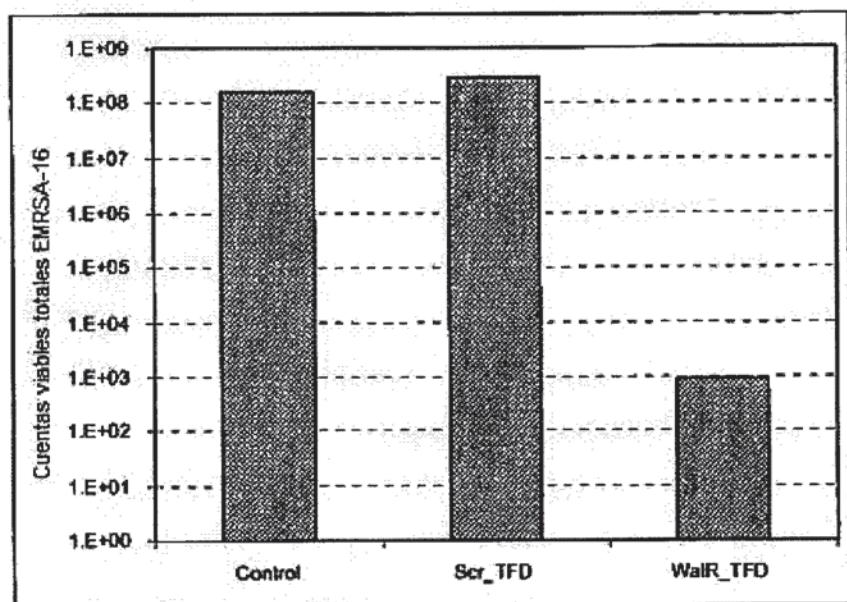
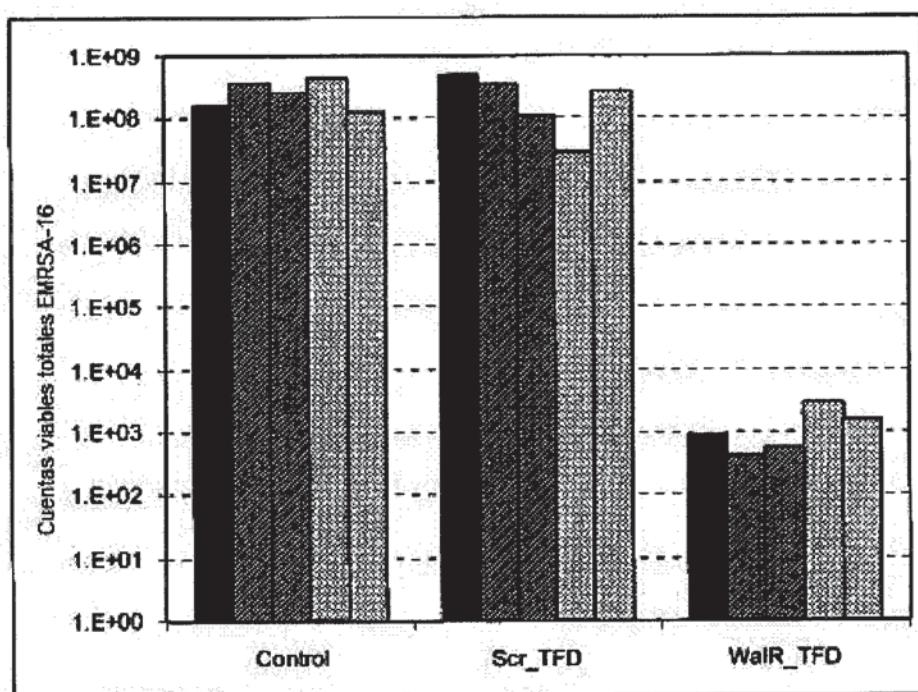
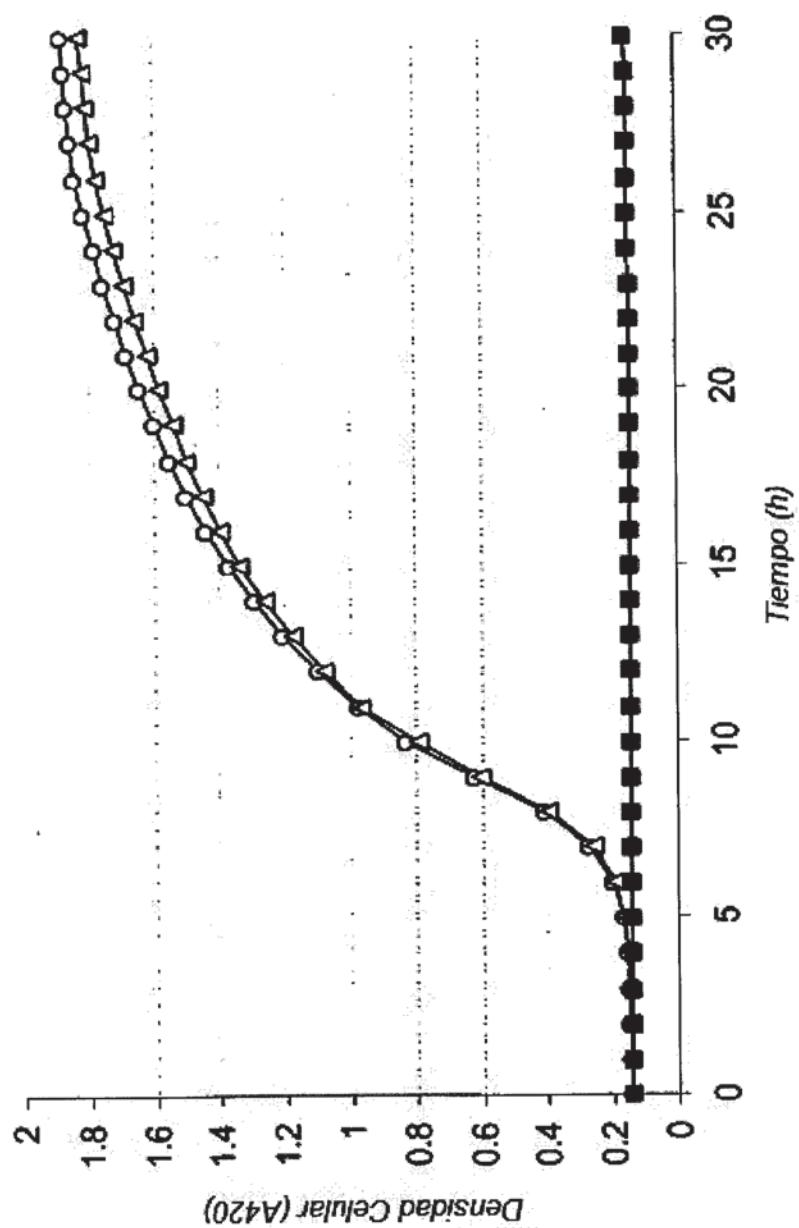
**Figura 17A****Figura 17B**

Figura 17C

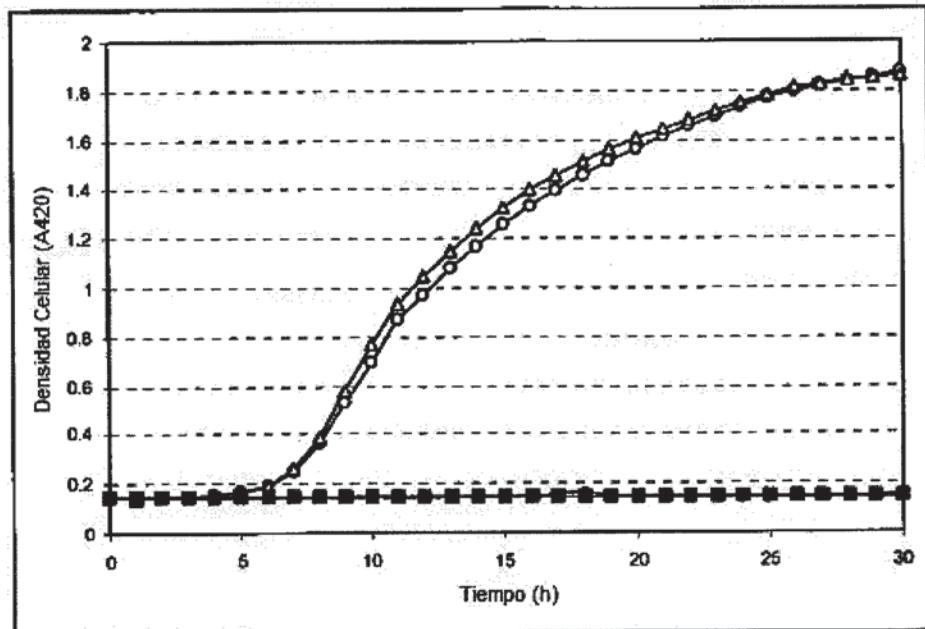


Figura 18

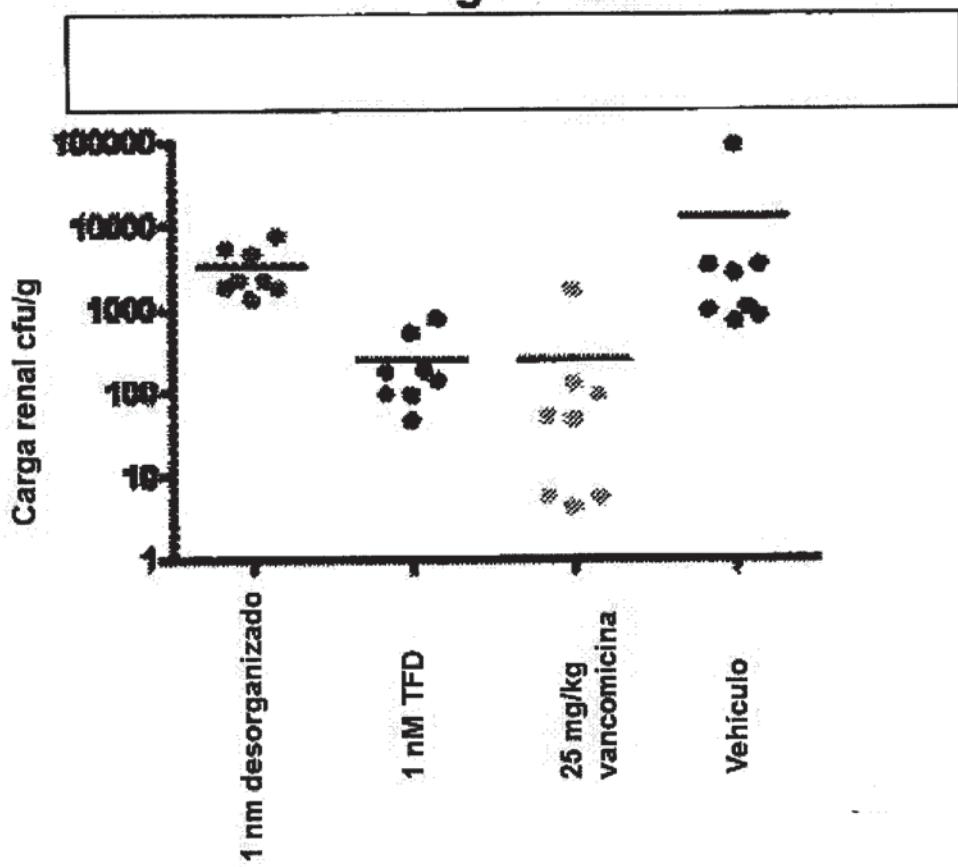


Figura 19

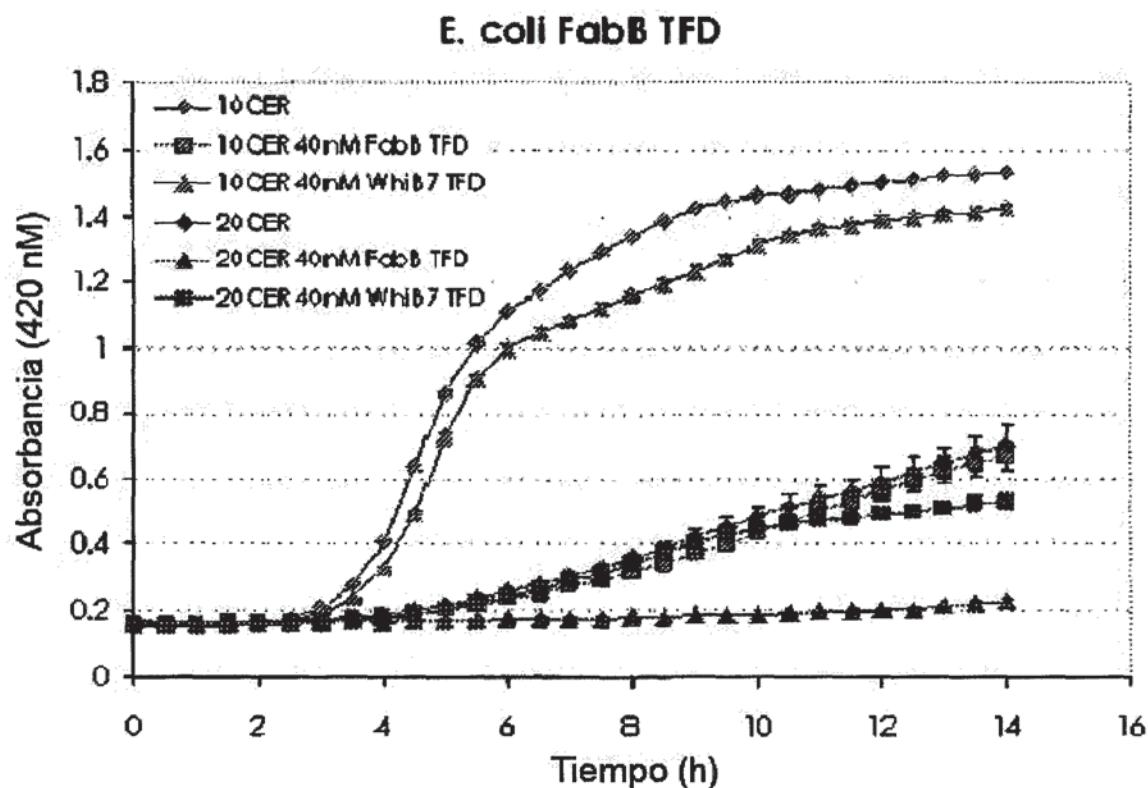
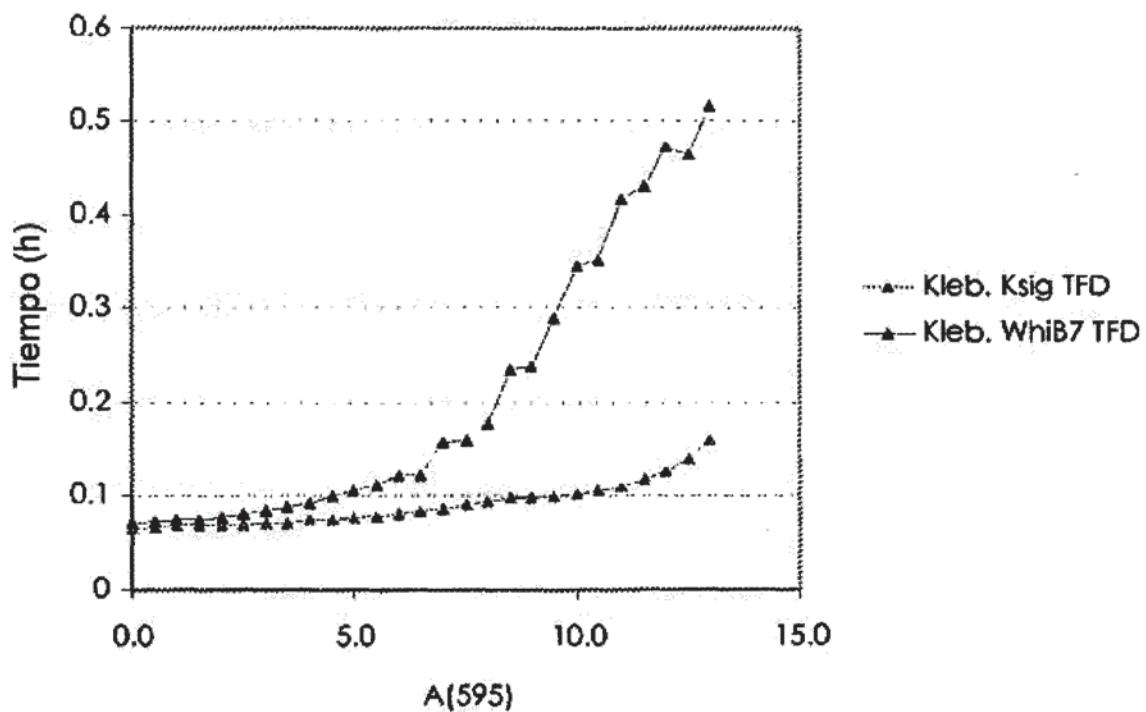
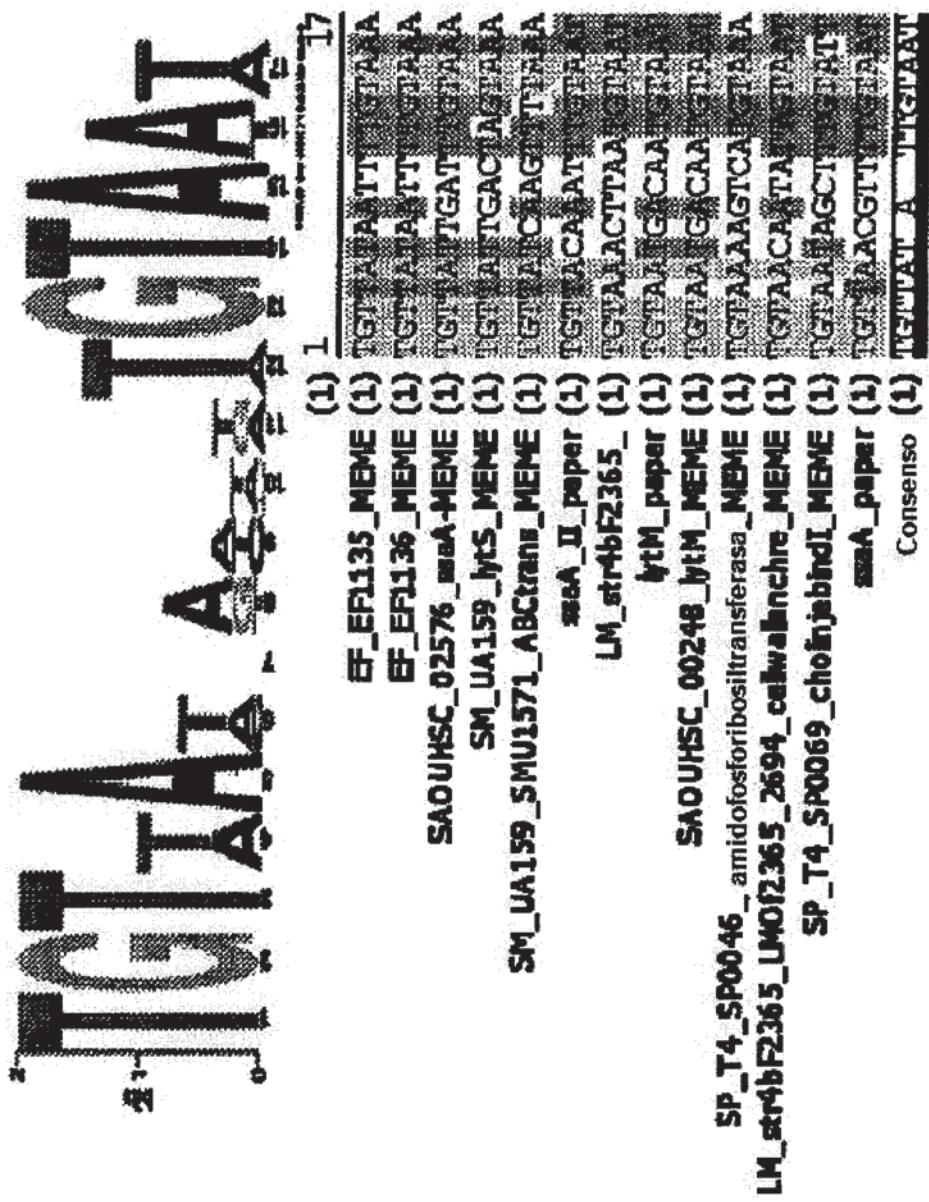
**Figura 20****Figura 21**

Figura 22



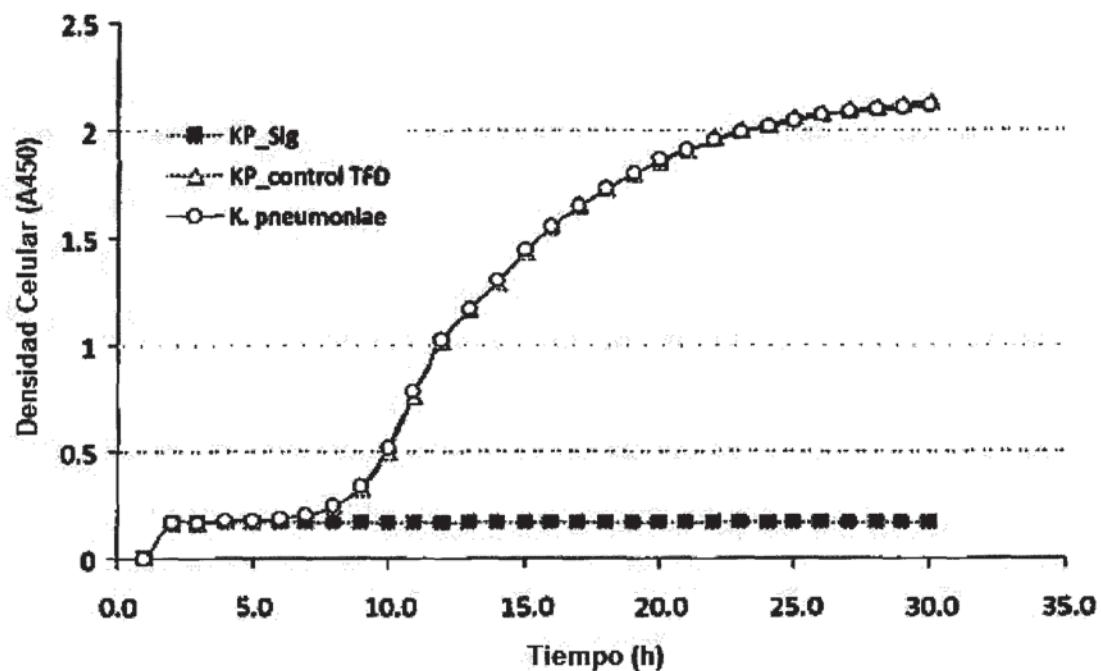
A.



B.

NC_00632_ABC117	1.72	1.21
NC_00632_BLA0319	1.202	1.21
NC_00670_BCA2193	1.202	1.21
NC_00730_GBA1815	4	1.21
NC_00946_BAS160	4	1.21
NC_00997_BAS145	4	1.21
NC_00979_BAS160	1.34	1.21
NC_00979_BAS160	1.36	1.21
NC_00970_BAS1461	1.36	1.21
NC_00941_NYAN 047	1.36	1.21
NC_00903_SAV1 010	1.36	1.21
NC_00947_SAV1 010	1.36	1.21
NC_00793_SAO1FSC_00064	1.36	1.21
NC_00793_SAO1FSC_0064	1.36	1.21
NC_00722_SAB007	1.36	1.21
NC_00672_AW0640	1.36	1.21
NC_00683_SAV1648	1.36	1.21
NC_00652_SAB071	1.36	1.21
NC_00661_SAO0073	1.36	1.21
NC_00739_SAV1678	1.36	1.21
NC_00743_SAO001	1.36	1.21
NC_01190_BCO_1023	1.4	1.21
NC_01770_BCA100	1.4	1.21
NC_01160_BCA107_A1036	1.4	1.21
NC_00639_BA121-192	1.4	1.21
NC_00674_BCA21165	1.4	1.21
NC_00610_BPA040	1.79	1.21
NC_00604_BPA1109	1.5	1.21
NC_01173_BCA10820_1667	1.71	1.21
NC_01173_BCA10730_1666	1.71	1.21
NC_01173_BCB4264_A1672	1.71	1.21
NC_01173_BCB4264_A1601	1.71	1.21
NC_01160_BCA107_A103	1.71	1.21
NC_01653_BCA107_A103	1.71	1.21

Figura 23

**Figura 24A****Figura 24B**