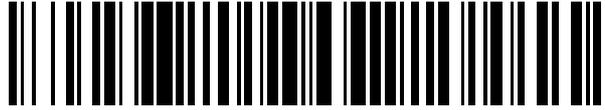


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 928**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2012 PCT/GB2012/000403**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.11.2016 WO2012150433**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2012 E 12723885 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2705149**

54 Título: **Método para identificar dianas antibióticas por secuenciación complementada**

30 Prioridad:

05.05.2011 GB 201107516

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

06.02.2017

73 Titular/es:

**DISCUVA LIMITED (100.0%)
Merrifield Centre, Rosemary Lane
Cambridge, Cambridgeshire CB1 3LQ, GB**

72 Inventor/es:

**WILLIAMS, DAVID HUGH y
TURNER, ARTHUR KEITH**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 599 928 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para identificar dianas antibióticas por secuenciación complementada.

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a métodos para identificar un gen esencial que sirve como una diana antibiótica en bacterias, a métodos para identificar antibióticos y a procesos para producir antibióticos y composiciones farmacéuticas que comprenden dichos antibióticos.

10

Antecedentes de la invención

Hay una necesidad urgente de nuevos antibióticos para contrarrestar la aparición de nuevos patógenos y la resistencia a los fármacos antimicrobianos existentes. La identificación de las dianas de los antibióticos candidatos es crítica, puesto que tal información puede proporcionar acceso a un gran número de familias de fármacos novedosas relacionadas funcionalmente. Por ejemplo, el descubrimiento de las proteínas de unión a penicilina como dianas de la penicilina condujo al desarrollo de una gran familia de antibióticos, incluyendo múltiples generaciones de cefalosporinas, penicilinas y carbapenemas (véase Schmid (2006) Nature Biotechnology 24(4): 419-420).

15

20 La secuenciación de sitio de inserción dirigida de transposón (TraDIS - véase Langridge y col. (2009) Genome Research 19: 2308-2316) se ha descrito y usado recientemente para identificar: (a) genes esenciales; (b) genes ventajosos (pero no esenciales) para el crecimiento; (c) genes desventajosos para el crecimiento en condiciones particulares; y (d) genes implicados en conferir tolerancia a ciertas condiciones (genes esenciales "específicos de nicho"). Se han descrito técnicas similares en, por ejemplo, Gawronski y col. (2009) PNAS 106: 16422-16427; Goodman y col. (2009) Cell Host Microbe 6: 279-289; van Opijnen y col. (2009) Nat. Methods 6: 767-772 y Gallagher y col. (2011) mBio 2(1): e00315-10, y dichas técnicas se apodan ahora comúnmente métodos "Tn-seq".

25

Sin embargo, una clase importante de dianas antibióticas son los productos génicos implicados en procesos celulares esenciales para la viabilidad en las condiciones de crecimiento utilizadas. Dichas dianas no pueden ser identificadas por Tn-seq (incluyendo TraDIS), ya que las inserciones de transposones en genes esenciales (incluyendo aquellos que sirven como dianas antibióticas) no se representan de manera significativa en el grupo mutante inicial. Por lo tanto, no surgirán diferencias en la distribución de transposones después del crecimiento del grupo mutante con o sin (o con cantidades variables de) antibiótico, con el resultado de que Tn-seq no puede distinguir entre un gen esencial y un gen esencial que sirve como una diana antibiótica.

35

Por lo tanto, existe la necesidad de selecciones funcionales de alto rendimiento para las dianas antibióticas que sean capaces de identificar genes esenciales que sirvan como dianas antibióticas.

Resumen de la invención

40

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para identificar un gen esencial que sirve como una diana antibiótica en una bacteria, comprendiendo el método las etapas de:

(a) generar un mutante resistente a antibióticos de dicha bacteria mediante un método que comprende la etapa de seleccionar el crecimiento en presencia de dicho antibiótico para producir un clon del mutante resistente a antibióticos (mutante Ab^R);

45

(b) transformar el mutante Ab^R con: (i) uno o más genes esenciales de dicha bacteria; y (ii) un transposón que inactiva por inserción el ADN bacteriano, para producir un grupo de transposones mutantes que son merodiploides para dichos uno o más genes esenciales y que llevan uno o más genes inactivados mediados por transposones;

50

(c) cultivar bacterias del grupo merodiploide en presencia de diferentes cantidades de dicho antibiótico para producir dos o más cultivos de ensayo; y

(d) comparar la distribución de las inserciones de transposones entre cultivos de ensayo para identificar un gen esencial putativo que sirve como una diana de dicho antibiótico en dicha bacteria.

55

Preferiblemente, en la etapa (b) el mutante Ab^R se transforma en primer lugar con ADN vectorial que comprende el uno o más genes esenciales de dicha bacteria. Adicionalmente, en la etapa (b) el mutante Ab^R se transforma en primer lugar con ADN vectorial que comprende el uno o más genes esenciales de dicha bacteria y después con el transposón. En dichas realizaciones, el mutante Ab^R puede transformarse en primer lugar con un elemento

extracromosómico (por ejemplo, un plásmido o BAC) que comprende: (i) uno o más genes esenciales de dicha bacteria; y (ii) una o más secuencias de repetición de transposón; y después puede transformarse (por ejemplo, por conjugación con una bacteria donante) con un plásmido de suministro de transposón que comprende: (i) un gen que codifica una transposasa; y (ii) sitios de reconocimiento de transposasa de repetición invertida; donde la una o más 5 secuencias de repetición de transposón del elemento extracromosómico confieren inmunidad de transposón contra el transposón suministrado por el plásmido de suministro de transposón.

El método puede comprender adicionalmente las etapas de:

- 10 (a) generar un grupo de bacterias mutantes por mutagénesis por transposones con un transposón de activación (T_{NA}), en el que el T_{NA} comprende un promotor de tal forma que la inserción del transposón en el ADN bacteriano aumenta la transcripción de un gen en o cerca del sitio de inserción;
- (b) cultivar bacterias del grupo de mutantes en presencia de diferentes cantidades de dicho antibiótico para producir dos o más cultivos de ensayo; y
- 15 (c) comparar la distribución de las inserciones de T_{NA} entre los cultivos de ensayo para identificar un gen esencial putativo que sirve como una diana de dicho antibiótico en dicha bacteria.

En otro aspecto, se proporciona un método para identificar un antibiótico que comprende identificar un gen esencial que sirva como una diana de dicho antibiótico de acuerdo con un método de la invención.

- 20 En un aspecto adicional, se proporciona un proceso para producir un antibiótico que comprende identificar un antibiótico mediante un método que comprende identificar un gen esencial que sirva como una diana de dicho antibiótico de acuerdo con un método de la invención. Adicionalmente, tal proceso puede comprender opcionalmente la etapa de sintetizar dicho antibiótico, y adicionalmente puede comprender opcionalmente mezclar el antibiótico 25 sintetizado con un excipiente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica.

En un aspecto adicional más, se proporciona un método para identificar un gen (por ejemplo, un gen esencial) que sirve como una diana antibiótica en una bacteria, que comprende el método las etapas de:

- 30 (a) transformar bacterias con un elemento extracromosómico (por ejemplo, un plásmido o BAC) que comprende: (i) uno o más genes esenciales de dicha bacteria; y (ii) una o más secuencias de repetición de transposón, para producir un grupo de bacterias que son merodiploides para dichos uno o más genes esenciales; y
- 35 (b) transformar los merodiploides de la etapa (a) con un plásmido de suministro de transposón que comprende: (i) un gen que codifica una transposasa; y (ii) sitios de reconocimiento de transposasa de repetición invertida;

en el que la una o más secuencias de repetición de transposón del elemento extracromosómico de la etapa (a) confieren inmunidad de transposón contra el transposón suministrado por el plásmido de la etapa (b).

- 40 En un aspecto adicional más, se proporciona un plásmido de suministro de transposón que comprende: (i) un gen que codifica una transposasa; y (ii) sitios de reconocimiento de transposasa de repetición invertida, para su uso en el método de la invención.

- 45 En otro aspecto, se proporciona un kit que comprende un plásmido de suministro de transposón que comprende: (i) un gen que codifica una transposasa; y (ii) sitios de reconocimiento de transposasa de repetición invertida, opcionalmente que comprende adicionalmente un plásmido o BAC que comprende: (i) uno o más genes esenciales de una bacteria; y (ii) una o más secuencias de repetición de transposón, cuyas secuencias de repetición confieren 50 inmunidad de transposón contra el transposón suministrado por el plásmido de suministro de transposón.

- El uso de grupos de mutantes de transposón generados a partir de mutantes con resistencia antibiótica que son merodiploides para uno o más genes esenciales asegura que las inserciones de transposón en genes esenciales (incluyendo los que sirven como dianas antibióticas) se representan en el grupo mutante inicial, ya que las inserciones de transposón en el gen de diana antibiótica producen fenotipos viables en condiciones no selectivas 55 (cuando la copia de tipo silvestre del gen esencial complementa la copia mutante inactivada por inserción), pero no en condiciones selectivas (cuando la copia de tipo silvestre no complementa la copia mutante inactivada por inserción).

Por lo tanto, pueden detectarse fácilmente diferentes en la distribución de transposones después del crecimiento del

grupo de mutantes merodiploides con o sin antibiótico, permitiendo la identificación de genes esenciales que sirven como dianas antibióticas.

Otros aspectos y realizaciones preferidas de la invención se definen y se describen en las otras reivindicaciones 5 expuestas a continuación.

Descripción detallada de la invención

Definiciones y preferencias generales

10

Cuando se usan en el presente documento y a menos que se indique específicamente otra cosa, los siguientes términos pretenden tener los siguientes significados además de cualquier significado más amplio (o más restrictivo) que los términos puedan poseer en la técnica:

15 A menos que se requiera de otro modo por el contexto, el uso en el presente documento del singular se interpretará que incluye el plural y viceversa. Los términos "un" o "una" usados en relación con una entidad se interpretará que se refieren a una o más de esa entidad. Como tal, los términos "un" (o "una"), "uno o mas" y "al menos uno" se usan de forma intercambiable en el presente documento.

20 Como se usa en el presente documento, el término "comprender", o variaciones del mismo, tales como "comprende" o "que comprende" pretenden indicar la inclusión de cualquier número entero mencionado (por ejemplo, un rasgo, elemento, característica, propiedad, etapa de método/proceso o limitación) o grupo de números enteros (por ejemplo, rasgos, elemento, características, propiedades, etapas de método/proceso o limitaciones) pero no la exclusión de ningún número entero diferente o grupo de números enteros. Por lo tanto, como se usa en el presente 25 documento, la expresión "que comprende" es inclusiva o abierta y no excluye números enteros o etapas de método/proceso adicionales, no mencionados.

El término *gen* es un término que describe una unidad hereditaria que consiste en una secuencia de ADN que ocupa una ubicación específica en un cromosoma o plásmido y determina una característica particular en un organismo. Un 30 gen puede determinar una característica de un organismo especificando una cadena polipeptídica que forma una proteína o parte de una proteína (gen estructural); o codificar una molécula de ARN; o regular la operación de otros genes o reprimir dicha operación; o afectar al fenotipo mediante algún otro mecanismo aún no definido.

La expresión *ADN genómico* es una expresión de la técnica usada en el presente documento para definir el ADN 35 cromosómico como distinto del ADN plasmídico mantenido extracromosómicamente.

El término *genoma* es un término de la técnica usado en el presente documento para definir el complemento genético en su totalidad de un organismo, y por lo tanto incluye cromosómico, plasmídico, profago y cualquier otro 40 ADN.

La expresión *bacteria Gram-positiva* es una expresión de la técnica que define una clase particular de bacterias que se agrupan en función de ciertas características de tinción de la pared celular.

La expresión *bacteria Gram-positiva con G + C bajo* es una expresión de la técnica que define una clase subclase 45 particular de bacterias evolutivamente relacionadas dentro de las Gram-positivas en base a la composición de las bases en el ADN. La subclase incluye *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp. y *Lactobacillus* spp.).

La expresión *bacteria Gram-positiva con G + C alto* es una expresión de la técnica que define una clase subclase 50 particular de bacterias evolutivamente relacionadas dentro de las Gram-positivas en base a la composición de las bases en el ADN. La subclase incluye actinomicetos (actinobacteria) incluyendo *Actinomyces* spp., *Arthrobacterspp.*, *Corynebacterium* spp., *Frankia* spp., *Micrococcus* spp., *Micromonospora* spp., *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Propionibacterium* spp. y *Streptomyces* spp.

55 La expresión *bacteria Gram-negativa* es una expresión de la técnica que define una clase particular de bacterias que se agrupan en base a ciertas características de tinción de la pared celular. Los ejemplos de géneros de bacterias Gram-negativas incluyen *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Neisseria*.

Como se usa en el presente documento, la expresión "gen esencial" es una expresión de la técnica que define una

clase particular de genes cuyos productos son necesarios para la viabilidad, en todas las condiciones o en las condiciones de crecimiento usadas. Una subclase importante de gen esencial son aquellos que codifican productos (por ejemplo, proteínas, péptidos y polinucleótidos de regulación) que contribuyen a los procesos metabólicos esenciales para la viabilidad en condiciones de crecimiento importantes (por ejemplo, y en el caso de las bacterias patógenas, en condiciones que prevalecen durante la infección o la multiplicación en el huésped).

Antibióticos y dianas antibióticas

El antibiótico usado para producir los cultivos de ensayo de la divulgación es típicamente un antibiótico de investigación novedoso (agente quimioterapéutico anti-bacteriano), cuyo mecanismo de acción (y por lo tanto, cuya diana o dianas biológicas) se desconoce. En muchas aplicaciones, el antibiótico se selecciona entre bibliotecas combinatorias, bibliotecas de productos naturales, entidades químicas definidas, péptidos, miméticos peptídicos y oligonucleótidos

15 La diana antibiótica identificada de acuerdo con la invención es un gen esencial/producto génico y, por lo tanto, puede estar implicado en uno o más de los siguientes procesos biológicos en el huésped bacteriano:

- (a) división celular;
- (b) replicación de ADN (incluyendo polimerización y superhelicidad);
- 20 (c) transcripción (incluyendo cebado, elongación y terminación);
- (d) traducción (incluyendo componentes ribosomales, inicio, elongación y liberación);
- (e) rutas biosintéticas (incluyendo peptidoglicanos y ácidos grasos);
- (f) adición plasmídica;
- (g) conjunto de la pared celular; y/o
- 25 (h) integridad celular bacteriana.

Bacterias para su uso en los métodos de la invención

Los métodos de la invención pueden aplicarse para identificar una diana antibiótica en cualquier bacteria. Por lo tanto, los métodos de la invención encuentran aplicación en la identificación de dianas antibióticas en: (a) bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y/o Gram-variables; (b) bacterias formadoras de esporas; (c) bacterias no formadoras de esporas; (d) bacterias filamentosas; (e) bacterias intracelulares; (f) aerobios obligados; (g) anaerobios obligados; (h) anaerobios facultativos; (i) bacterias microaerófilas y/o (f) patógenos bacterianos oportunistas.

35 En ciertas realizaciones, los métodos de la invención se aplican para identificar una diana antibiótica en bacterias de los siguientes géneros: *Acinetobacter* (por ejemplo, *A. baumannii*); *Aeromonas* (por ejemplo, *A. hydrophila*); *Bacillus* (por ejemplo, *B. anthracis*); *Bacteroides* (por ejemplo, *B. fragilis*); *Bordetella* (por ejemplo, *B. pertussis*); *Borrelia* (por ejemplo, *B. burgdorferi*); *Brucella* (por ejemplo, *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis* y *B. suis*); *Burkholderia* (por ejemplo, *B. cepacia complex*); *Campylobacter* (por ejemplo, *C. jejuni*); *Chlamydia* (por ejemplo, *C. trachomatis*, *C. suis* y *C. muridarum*); *Chlamydophila* (por ejemplo, (por ejemplo, *C. pneumoniae*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. felis* y *C. caviae*); *Citrobacter* (por ejemplo, *C. freundii*); *Clostridium* (por ejemplo, *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens* y *C. tetani*); *Corynebacterium* (por ejemplo, *C. diphtheriae* y *C. glutamicum*); *Enterobacter* (por ejemplo, *E. cloacae* y *E. aerogenes*); *Enterococcus* (por ejemplo, *E. faecalis* y *E. faecium*); *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*); *Flavobacterium*; *Francisella* (por ejemplo, *F. tularensis*); *Fusobacterium* (por ejemplo, *F. necrophorum*); *Haemophilus* (por ejemplo, *H. somnus*, *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*); *Helicobacter* (por ejemplo, *H. pylori*); *Klebsiella* (por ejemplo, *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*); *Legionella* (por ejemplo, *L. pneumophila*); *Leptospira* (por ejemplo, *L. interrogans*); *Listeria* (por ejemplo, *L. monocytogenes*); *Moraxella* (por ejemplo, *M. catarrhalis*); *Morganella* (por ejemplo, *M. morganii*); *Mycobacterium* (por ejemplo, *M. leprae* y *M. tuberculosis*); *Mycoplasma* (por ejemplo, *M. pneumoniae*); *Neisseria* (por ejemplo, *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*); *Pasteurella* (por ejemplo, *P. multocida*); *Peptostreptococcus*; *Prevotella*; *Proteus* (por ejemplo, *P. mirabilis* y *P. vulgaris*); *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*); *Rickettsia* (por ejemplo, *R. rickettsii*); *Salmonella* (por ejemplo, serotypes Typhi y Typhimurium); *Serratia* (por ejemplo, *S. marcescens*); *Shigella* (por ejemplo, *S. flexneria*, *S. dysenteriae* y *S. sonnei*); *Staphylococcus* (por ejemplo, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. intermedius*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*); *Stenotrophomonas* (por ejemplo, *S. maltophilia*); *Streptococcus* (por ejemplo, *S. agalactiae*, *S. mutans*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*); *Treponema* (por ejemplo, *T. pallidum*); *Vibrio* (por ejemplo, *V. cholerae*) y *Yersinia* (por ejemplo, *Y. pestis*).

Los métodos de la invención pueden usarse para identificar una diana antibiótica en bacterias resistentes a múltiples fármacos, incluyendo, pero sin limitación, cepas bacterianas resistentes a la penicilina, resistentes a la metilicina, resistentes a quinolona, resistentes a macrólidos, y/o resistentes a vancomicina, incluyendo, por ejemplo,

Streptococcus pneumoniae resistente a la penicilina, resistente a metacilina, resistente a macrólidos, resistente a vancomicina, y/o resistente a quinolona; *Staphylococcus aureus* resistente a la penicilina, resistente a meticilina, resistente a macrólidos, resistente a vancomicina y/o resistente a quinolona; *Streptococcus pyogenes* resistente a la penicilina, resistente a meticilina, resistente a macrólidos, resistente a vancomicina, y/o resistente a quinolona; y 5 enterococos resistentes a la penicilina, resistentes a meticilina, resistentes a macrólidos, resistentes a vancomicina y/o resistentes a quinolona.

Por lo tanto, los métodos de la invención pueden usarse para identificar una diana antibiótica en *Staphylococcus aureus* resistente meticilina (MRSA), por ejemplo, seleccionado de cualquiera de C-MSRA1, C-MRSA2, C-MRSA3, 10 C-MSRA4, MRSA Belga, MRSA Suizo y cualquiera de las cepas de EMRSA.

Los compuestos de la divulgación pueden usarse para identificar una diana antibiótica tanto en bacterias Gram-positivas con G+C alto como bacterias Gram-positivas con G+C bajo.

15 Los métodos de la invención encuentran aplicación particular en la identificación de una diana antibiótica en una bacteria seleccionada entre *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* (incluyendo ST131), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* y *Neisseria gonorrhoeae*.

20 Se prefieren particularmente métodos de identificación de una diana antibiótica en *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* o *Escherichia coli*.

Grupos de mutantes

25 Los métodos de la divulgación invención implican la generación de un grupo de bacterias mutantes por mutagénesis de transposones. El tamaño del grupo de mutantes afecta a la resolución del método: a medida que aumenta el tamaño del grupo, estarán representados cada vez más genes diferentes con inserciones de transposones (y por lo tanto, ensayados con eficacia). A medida que el tamaño del grupo disminuye, la resolución del método se reduce, los genes se ensayarán con menos eficacia, y cada vez más genes no se ensayarán en absoluto.

30 Idealmente, el grupo de mutantes generado en los métodos de la invención es integral, en el sentido de que se representan las inserciones en cada gen (y preferiblemente en varios sitios diferentes en todos y cada gen). El número de mutantes de inserción de transposón (es decir, el tamaño del grupo de mutantes) requerido para alcanzar esto depende de varios factores, incluyendo: (a) el tamaño del genoma bacteriano; (B) el tamaño medio de los 35 genes; y (c) cualquier preferencia del sitio de inserción de transposón.

Con respecto a esto último, algunas áreas de los genomas bacterianos atraen una baja frecuencia de inserción (regiones especialmente ricas en GC). Por lo tanto, las frecuencias de inserción y el tamaño de los grupos son lo 40 suficientemente grandes como para asegurar que se prefieren las inserciones en las regiones de inserción y refractarias.

En general, se requiere una tasa de inserción mínima de un transposón por 25 pb para conseguir un grupo/biblioteca completa, que típicamente implica un tamaño de grupo mínimo para bacterias que tienen un tamaño genómico de 4 a 7 Mb de $0,5 \times 10^5$ a 1×10^5 , por ejemplo 5×10^5 , preferiblemente al menos aproximadamente 1×10^6 mutantes. En 45 muchos casos, 1×10^6 mutantes permiten la identificación de ~300.000 sitios de inserción diferentes y corresponden a 1 inserción de transposón cada 13 a 23 pb (o aproximadamente 40-70 sitios de inserción diferentes por gen).

Sin embargo, los métodos de la invención no requieren necesariamente un grupo de mutantes completo (en el sentido que se ha definido anteriormente) con el fin de devolver información útil en cuanto a la identidad de las 50 dianas farmacológicas antibióticas. Más bien, pueden usarse tamaños de grupo menores que el grupo completo ideal, a condición de que pueda tolerarse una reducción de la resolución (y el consiguiente fracaso a la hora de ensayar ciertos genes). Este puede ser el caso, por ejemplo, cuando el método está diseñado para realizarse de forma iterativa hasta que se identifica la diana: en tales realizaciones, el tamaño eficaz del grupo crece con cada repetición del método.

55 Creación de merodiploides

Están disponibles varios métodos para la creación del estado merodiploide en los métodos de la invención. Estos incluyen, sin limitación: (a) la creación de una región duplicada del cromosoma bacteriano mediante inserción

usando un vector suicida; (B) la creación de una región duplicada del cromosoma bacteriano por inserción usando un plásmido integrador; (C) la creación de una secuencia duplicada mantenida en el ADN extracromosómico mediante la adición de plásmidos; y (d) la creación de una secuencia duplicada mantenida en el ADN extracromosómico mediante la adición de un cromosoma artificial bacteriano (BAC).

5

Los métodos de integración pueden usar recombinación específica de sitio u homóloga.

Se prefieren métodos de vector suicida ya que esto permitirá la adición de genes en fases y, por lo tanto, el estado merodiploide completo puede construirse de forma iterativa en el transcurso de varias transformaciones.

10

Mutagénesis de transposones

Los transposones, a veces denominados elementos transponibles, son polinucleótidos móviles. El término transposón se conoce bien por los expertos en la técnica e incluye clases de transposones que se pueden distinguir en base a la organización de secuencias, por ejemplo, repeticiones cortas invertidas en cada extremo; repeticiones terminales largas directamente repetidas (LTR) en los extremos; y poliA en los extremos 3' de los transcritos de ARN con los extremos 5' truncados a menudo.

15

Los transposomas son complejos de transposasa-transposón en los que el transposón no codifica la transposasa. Por lo tanto, una vez insertado, el transposón es estable. Preferiblemente, con el fin de asegurar la estabilidad del grupo de mutantes, el transposón no codifica la transposasa y se proporciona en forma de un transposoma (es decir, como un complejo con enzima transposasa), como se describe a continuación.

20

El transposón/transposoma puede introducirse en el ADN genómico y/o plasmídico dentro de las células bacterianas por cualquiera de una amplia diversidad de procedimientos estándar que se conocen bien por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los transposomas pueden introducirse por electroporación (o cualquier otro método de transformación adecuado).

25

Preferiblemente, el método de transformación genera de 1×10^3 a 5×10^3 transformantes/ng de ADN, y tales eficiencias de transformación pueden conseguirse generalmente usando electroporación.

30

Como alternativa, la mutagénesis de transposón se puede realizar *in vitro* y las moléculas recombinantes se transforman/transfectan en células bacterianas. En tales realizaciones, los transposomas pueden prepararse de acuerdo con un protocolo estándar mediante la mezcla de la enzima transposasa disponible en el mercado con el fragmento de ADN transposón. Los transposomas resultantes se mezclan a continuación con el ADN plasmídico del plásmido de interés para permitir la transposición, después, el ADN introducido en una cepa bacteriana huésped usando electrotransformación para generar un grupo de mutantes de transposón de plásmido.

35

En realizaciones en las que se realiza la mutagénesis *in vitro*, es posible mezclar transposomas con ADN genómico *in vitro* y después introducir el ADN mutagenizado (opcionalmente, después de la fragmentación y/o circularización) en la cepa bacteriana huésped (por ejemplo, mediante electroporación) después de lo cual la maquinaria de recombinación endógena lo incorpora en el genoma. Tal enfoque puede ser *particularmente* útil en el caso de las bacterias que son naturalmente competentes (por ejemplo, *Acinetobacter* spp.) y/o puede incorporar ADN a través de eventos de recombinación de entrecruzamiento homólogo (por ejemplo, entrecruzamiento doble).

45

En los métodos de la divulgación, el mutante Ab^R se transforma con: (i) uno o más genes esenciales de dicha bacteria; y (ii) un transposón que inactiva por inserción el ADN bacteriano, para producir un grupo de transposones mutantes que son merodiploides para dichos uno o más genes esenciales. El mutante Ab^R: (a) puede transformarse simultáneamente con el uno o más genes esenciales de dicha bacteria y el transposón; (b) puede transformarse en primer lugar con el transposón y después con el uno o más genes esenciales de dicha bacteria; o (c) puede transformarse en primer lugar con el uno o más genes esenciales de dicha bacteria y después con el transposón.

50

Cuando el mutante Ab^R se transforma simultáneamente con el uno o más genes esenciales de dicha bacteria y el transposón, o se transforma en primer lugar con el uno o más genes esenciales de dicha bacteria y después con el transposón, puede producirse la inserción de transposones no deseada en los genes esenciales introducidos, que puede reducir la eficiencia de la formación merodiploide y complicar el análisis de los datos obtenidos de dichas bibliotecas.

55

Tales problemas se evitan cuando el mutante Ab^R se transforma en primer lugar con el transposón y después con el

uno o más genes esenciales de dicha bacteria. Sin embargo, dependiendo de la eficiencia del proceso usado para introducir el gen o genes esenciales, tal estrategia puede requerir un número significativamente mayor de los experimentos de transformación para dar una biblioteca de tamaño suficiente. Una solución alternativa explota el fenómeno de la inmunidad de transposición. Aquí, se elimina (o se reduce) la transposición no deseada en los genes esenciales introducidos mediante la incorporación de secuencias repetidas de transposón en el ADN extracromosómico (típicamente, un plásmido o BAC) que lleva los genes esenciales usados para crear los merodiploides. Tal estrategia puede usarse junto con transposones en base a, por ejemplo, Tn3 o relacionados, como se describe a continuación.

10 Transposones para su uso en los métodos de la invención

Puede usarse cualquier transposón adecuado en los métodos de la invención. Los transposones adecuados incluyen los basados en Tn3 y los transposones tipo Tn3 (Clase II) incluyendo $\gamma\delta$ (Tn1000), Tn501, Tn2501, Tn21, Tn917 y relacionados. Además, Tn10, Tn5, *TnphoA*, Tn903, bacteriofago Mu y bacteriófagos transponibles relacionados. También están disponibles en el mercado una diversidad de transposones adecuados, incluyendo, por ejemplo, el transposón EZ-Tn5™ < R6K γ ori/KAN-2>.

Los transposones preferidos son los que llevan genes de resistencia a antibióticos (que pueden ser útiles en la identificación de mutantes que llevan un transposón) incluyendo Tn5, Tn10 y *TnphoA*. Por ejemplo, Tn10 lleva un gen con resistencia a la tetraciclina entre sus elementos de IS mientras que Tn5 lleva genes que codifican polipéptidos que confieren resistencia a la kanamicina, estreptomina y bleomicina. Otros genes de resistencia adecuados incluyen los que incluyen cloranfenicol acetiltransferasa (que confieren resistencia al cloranfenicol).

Por supuesto, es posible generar nuevos transposones mediante la inserción de diferentes combinaciones de genes de resistencia a antibióticos entre los elementos IS, o mediante la inserción de combinaciones de genes de resistencia a antibióticos entre los extremos mosaico de transposón (preferidos), o mediante la alteración de la secuencia de polinucleótido del transposón, por ejemplo, haciendo una sustitución de bases redundante, o cualquier otro tipo de sustitución de base que no afecta a la transposición o las características de resistencia a antibióticos del transposón, en la región de codificación de un gen con resistencia a antibióticos o en cualquier parte del transposón. Tales transposones se incluyen dentro del alcance de la divulgación.

En muchas realizaciones, se usa un único transposón para generar el grupo de mutantes. Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, el número de mutantes de inserción Tn (es decir, el tamaño del grupo de mutantes) requerido para conseguir un grupo o biblioteca completa depende, entre otras cosas, de cualquier preferencia de sitio de inserción Tn.

Así, en los casos en los que se produce la preferencia del sitio de inserción del transposón, pueden usarse dos o más transposones diferentes con el fin de reducir o eliminar la preferencia de sitios de inserción. Por ejemplo, se puede emplear una combinación de dos transposones diferentes en base a Tn5 y Tn10.

Los sistemas de transposones adecuados para su uso en los métodos que aprovechan el fenómeno de la inmunidad de transposición (como se ha descrito anteriormente) incluyen los basados en Tn3 y relacionados.

Por ejemplo, el plásmido de suministro de transposón pAMICS2 (véase la figura 2) contiene todo el sistema de generación de transposones basado en Tn3 (incluyendo genes que codifican las enzimas resolvasa y transposasa, TnpR y TNPA) y un origen de replicación (*oriR6K*) que funciona únicamente en ciertas cepas de *E. coli* que poseen el gen *pir*, evitando así la propagación de las bacterias de recepción después de la transposición. El plásmido también contiene el origen de movilización (*mobRP4*) para permitir la transferencia de una cepa donante, que es permisiva para la replicación del plásmido (es decir, contiene el gen *pir*) y que posee las funciones de transferencia del plásmido RP4, por conjugación. La propagación inadvertida del plásmido se puede detectar, si la transposición no se produce, por la presencia de un gen con resistencia a tobramicina (*aacA4*).

Por lo tanto, en otro aspecto de la divulgación se proporciona un método para identificar un gen (por ejemplo, un gen esencial) que sirve como una diana antibiótica en una bacteria, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) transformar bacterias con un elemento extracromosómico (por ejemplo, un plásmido o BAC) que comprende: (i) uno o más genes esenciales de dicha bacteria; y (ii) una o más secuencias de repetición de transposón, para producir un grupo de bacterias que son merodiploides para dichos uno o más genes esenciales; y

(b) transformar los merodiploides de la etapa (a) con un plásmido de suministro de transposón que comprende: (i) un gen que codifica una transposasa y una resolvasa; y (ii) sitios de reconocimiento de transposasa de repetición invertida;

5 en el que la una o más secuencias de repetición de transposón del elemento extracromosómico de la etapa (a) confieren inmunidad de transposón contra el transposón suministrado por el plásmido de la etapa (b).

En este aspecto de la divulgación, el sistema de suministro de transposón se basa preferiblemente en Tn3, por ejemplo, que contiene los genes *tnpA* y *tnpR* de Tn3. Se prefieren plásmidos de suministro de transposón que
10 comprenden adicionalmente uno o más genes de resistencia a antibióticos.

Determinar la distribución de las inserciones de transposón

La distribución de las inserciones de transposones se determina preferiblemente mediante la secuenciación de ADN bacteriano adyacente o cercano (5' y/o 3') al sitio de inserción (por ejemplo, mediante secuenciación de ADN que comprende uniones de ADN genómico de transposón). Típicamente, se secuencia el ADN bacteriano flanqueante o adyacente a uno o ambos extremos del transposón.

La longitud del ADN adyacente secuenciado no necesita ser extenso, y es preferiblemente, relativamente corto (por
20 ejemplo, menos de 200 pares de bases).

Pueden usarse diversos métodos para determinar la distribución de inserción de transposón usando la secuenciación del ADN: tales métodos se han denominado recientemente procedimientos Tn-seq (van Opijnen y col. (2009) Nat. Methods 6: 767-772). Por ejemplo, los procedimientos Tn-Seq incluyen purificación por afinidad de
25 uniones Tn amplificadas (Gawronski y col. (2009) PNAS 106: 16422-16427); ligación de adaptadores en las secuencias genómicas distales al extremo del transposón usando un sitio de restricción especializado (Goodman y col. (2009) Cell Host Microbe 6: 279-289; van Opijnen y col. (2009) Nat. Methods 6: 767-772); amplificación selectiva (Langridge y col. (2009) Genome Research 19: 2308-2316) y la generación de círculos de ADN monocatenario que llevan uniones Tn, que sirven como plantillas para la amplificación y secuenciación después de la eliminación de
30 ADN genómico por digestión de exonucleasa (Gallagher y col. (2011) mBio 2(1): e00315-10).

Puede usarse cualquier técnica de secuenciación de alto rendimiento adecuada, y hay muchas plataformas de secuenciación disponibles en el mercado que son adecuadas para su uso en los métodos de la invención. Las plataformas de secuenciación basadas en secuenciación por síntesis (SBS) son particularmente adecuadas para su
35 uso en los métodos de la invención: por ejemplo, el sistema Illumina™ genera millones de lecturas de secuencia relativamente cortas (54, 75 o 100 pb) y se prefiere particularmente.

Otras técnicas adecuadas incluyen métodos basados en terminadores de tinte reversibles. Aquí, las moléculas de ADN se unen en primer lugar a los cebadores en un portamuestras y se amplifican de modo que las colonias
40 clonales locales se formen (amplificación puente). Se añaden cuatro tipos de ddNTP, y los nucleótidos no incorporados se eliminan por lavado. A diferencia de la pirosecuenciación, el ADN sólo puede extenderse a un nucleótido a la vez. Una cámara toma imágenes de los nucleótidos marcados con fluorescencia, entonces el colorante junto con el bloqueador 3' terminal se elimina químicamente a partir del ADN, lo que permite el siguiente ciclo.

Otros sistemas capaces de lecturas de secuencia corta incluyen SOLiD™ y tecnologías por Ion Torrent (ambos vendidos por Applied Biosystems™). La tecnología SOLiD™ emplea secuenciación por ligación. Aquí, un grupo de todos los oligonucleótidos posibles de una longitud fija están etiquetados de acuerdo a la posición secuenciada. Los oligonucleótidos se hibridan y se ligan; la ligación preferencial por la ADN ligasa para emparejar secuencias da como
50 resultado una señal informativa del nucleótido en esa posición. Antes de la secuenciación, el ADN se amplifica por PCR en emulsión. Las perlas resultante, cada una sólo contiene copias de la misma molécula de ADN, se depositan sobre un portaobjetos de vidrio. El resultado son secuencias de cantidades y longitudes comparables con la secuenciación Illumina.

Ion Torrent Systems Inc. han desarrollado un sistema en base al uso de química de secuenciación estándar, pero con un sistema de detección basado en semiconductores novedoso. Este método de secuenciación se basa en la detección de iones de hidrógeno que se liberan durante la polimerización de ADN, a diferencia de los métodos ópticos usados en otros sistemas de secuenciación. Un micropocillo que contiene una cadena de ADN plantilla para secuenciar se inunda con un único tipo de nucleótido. Si el nucleótido introducido es complementario al nucleótido

plantilla principal, se incorpora a la cadena complementaria creciente. Esto causa la liberación de un ión de hidrógeno que activa un sensor de iones hipersensible, lo que indica que se ha producido una reacción. Si las repeticiones homopoliméricas están presentes en la secuencia plantilla, se incorporarán múltiples nucleótidos en un único ciclo. Esto conduce a un número correspondiente de hidrógenos liberados y una señal electrónica
5 proporcionalmente mayor.

Evaluación funcional de genes esenciales putativos

El gen esencial putativo identificado mediante la comparación de la distribución de las inserciones de transposones
10 entre cultivos de ensayo se puede caracterizar además por diversas técnicas que evalúan directa o indirectamente su función. De esta manera, puede asignarse definitivamente una función esencial a dicho gen esencial putativo.

Las técnicas adecuadas incluyen bioinformática, donde la secuencia (total o parcial) del gen esencial putativo se usa para interrogar las bases de datos de secuencias que contienen información de la bacteria ensayada y/o otras
15 especies con el fin de identificar los genes (por ejemplo, genes ortólogos en otras especies) para los que ya se han asignado una o más funciones bioquímicas esenciales y/o que han demostrado ser esenciales.

Los programas bioinformáticos adecuados se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen el programa herramienta de búsqueda de alineamiento local básico (BLAST) (Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y
20 Altschul y col. (1997) Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402). Las bases de datos adecuadas incluyen, por ejemplo, EMBL, GENBANK, TIGR, EBI, SWISS-PROT y trEMBL.

Como alternativa, o además, la secuencia (total o parcial) del gen esencial putativo se usa para interrogar una base de datos de secuencias que contiene información sobre la identidad de los genes esenciales que se han construido
25 previamente usando los métodos Tn-seq convencionales descritos en la técnica anterior (por ejemplo, como se describe en Gawronski y col. (2009) PNAS 106: 16422-16427; Goodman y col. (2009) Cell Host Microbe 6: 279-289; van Opijnen y col. (2009) Nat. Methods 6: 767-772; Langridge y col. (2009) Genome Research 19: 2308-2316; Gallagher y col. (2011) mBio 2(1): e00315-10) y/o las técnicas descritas en el documento WO 01/07651.

Como alternativa, o además, la esencialidad puede imputarse eliminando la posibilidad de que un gen esencial putativo actúe como un gen con resistencia a antibióticos. Por ejemplo, la secuencia (total o parcial) del gen esencial putativo se utiliza para interrogar las bases de datos de secuencias que contienen información de la secuencia de genes previamente identificados como genes con resistencia a antibióticos usando los métodos Tn-seq descritos en,
30 por ejemplo, Gawronski y col. (2009) PNAS 106: 16422-16427; Goodman y col. (2009) Cell Host Microbe 6: 279-289; Langridge y col. (2009) Genome Research 19: 2308-2316 o Gallagher y col. (2011) mBio 2(1): e00315-10. Los genes resistentes a antibióticos pueden identificarse en tales métodos como una clase de genes esenciales de nichos específicos/condicionalmente
35

Métodos analíticos auxiliares

Los métodos de la invención pueden usarse junto con otras técnicas para la identificación de genes esenciales, condicionalmente esenciales, no esenciales y/o esenciales que sirven como dianas para los antibióticos, como se describe a continuación:

45 (a) Activación de Tn-seq

El método de la divulgación puede comprender opcionalmente de forma adicional las etapas de:

- 50 (a) generar un grupo de bacterias mutantes por mutagénesis por transposones con un transposón de activación (T_{NA}), donde el T_{NA} comprende un promotor de tal forma que la inserción del transposón en el ADN bacteriano aumenta la transcripción de un gen en o cerca del sitio de inserción;
- (b) cultivar bacterias del grupo de mutantes en presencia de diferentes cantidades de dicho antibiótico para producir dos o más cultivos de ensayo; y
- 55 (c) comparar la distribución de inserciones de T_{NA} entre los cultivos de ensayo para identificar un gen esencial putativo que sirve como una diana de dicho antibiótico en dicha bacteria.

El uso de un transposón de activación asegura que las inserciones de transposones en genes esenciales se representan en el grupo de mutantes inicial, ya que la inserción de transposones ahora puede dar como resultado la activación génica en lugar de la inactivación por inserción. Por lo tanto, el efecto de la presencia de antibióticos

durante el cultivo posterior del grupo de mutantes en la distribución de transposones puede estudiarse (y la identidad de la diana o dianas génicas así determinada).

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "transposón de activación" (en lo sucesivo en el presente documento "TnA") define un transposón que comprende un promotor de tal forma que la inserción de transposón aumenta la transcripción de un gen en o cerca del sitio de inserción. Los ejemplos de tales transposones se describen en Troeschel y col. (2010) *Methods Mol Biol.* 668: 117-39 y Kim y col. (2008) *Curr Microbiol.* 57(4): 391-394.

10 El transposón/transosoma de activación puede introducirse en el ADN genómico y/o plasmídico dentro de las células bacterianas por cualquiera de una amplia diversidad de procedimientos estándar que se conocen bien por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los transosomas Tn_A pueden introducirse por electroporación (o cualquier otro método de transformación adecuado).

15 Puede usarse cualquier transposón de activación adecuado en los métodos de la invención. Los transposones adecuados incluyen los basados en Tn3 y los transposones tipo Tn3 (Clase II) incluyendo $\gamma\delta$ (Tn1000), Tn501, Tn2501, Tn21, Tn917 y relacionados. Además, Tn10, Tn5, Tn*phoA*, Tn903, el bacteriófago Mu y bacteriófagos transponibles relacionados. Además, también están disponibles en el mercado una diversidad de transposones adecuados, incluyendo, por ejemplo, el transposón EZ-Tn5TM < R6K γ ori/KAN-2>.

20 Los transposones preferidos son aquellos que llevan genes de resistencia a antibióticos (que pueden ser útiles en la identificación de mutantes que llevan un transposón), incluyendo Tn5, Tn10 y Tn*phoA*. Por ejemplo, Tn10 lleva un gen con resistencia a la tetraciclina entre sus elementos de IS mientras que Tn5 lleva genes que codifican polipéptidos que confieren resistencia a la kanamicina, estreptomycin y bleomicina. Otros genes de resistencia
25 adecuados incluyen los que incluyen cloranfenicol acetiltransferasa (que confiere resistencia al cloranfenicol).

Por supuesto, es posible generar nuevos transposones mediante la inserción de diferentes combinaciones de genes de resistencia a antibióticos entre elementos de IS, o mediante la inserción de combinaciones de genes de resistencia a antibióticos entre los extremos mosaico de transposón (preferidos), o mediante la alteración de la
30 secuencia polinucleotídica del transposón, por ejemplo, haciendo una sustitución de bases redundante en la región codificante de un gen con resistencia a antibióticos o en otro lugar en el transposón, o cualquier otro tipo de sustitución de base que no afecta a la transposición o las características de resistencia a antibióticos del transposón, en la región de codificación de un gen con resistencia a antibióticos o en cualquier parte en el transposón. Tales transposones se incluyen dentro del alcance de la invención.

35 En muchas realizaciones, se usa un único transposón para generar el grupo de mutantes. Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, el número de mutantes de inserción Tn (es decir, el tamaño del grupo de mutantes) requerido para conseguir un grupo o biblioteca completa depende, entre otras cosas, de cualquier preferencia del sitio de inserción Tn.

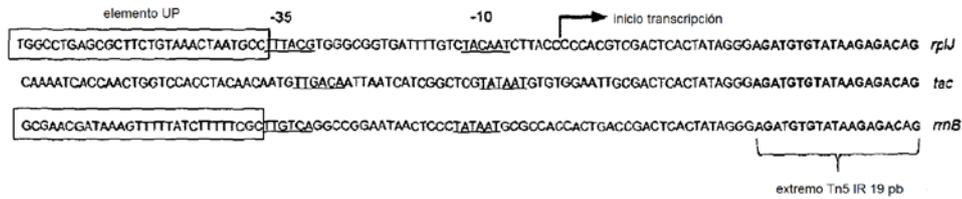
40 Por lo tanto, en casos en los que se produce la preferencia del sitio de inserción de transposón, pueden usarse dos o más transposones diferentes con el fin de reducir o eliminar la preferencia del sitio de inserción. Por ejemplo, se puede emplear una combinación de dos transposones diferentes en base a Tn5 y Tn10.

45 Promotores para su uso en la activación de transposones

La naturaleza del promotor presente en el Tn_A depende de la naturaleza del transposón y el huésped bacteriano final. Generalmente, se elige un promotor orientado hacia fuera eficiente que activa un alto nivel de transcripción de ADN cerca o adyacente al sitio de inserción.

50 El promotor puede incluir: (a) una caja de Pribnow (elemento -10); (b) un elemento -35 y/o (c) un elemento UP.

Por ejemplo, el promotor *lac* puede usarse con el transposón EZ-Tn5TM < R6K γ ori/KAN-2>, y dichas construcciones son adecuadas para el ensayo de, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. y otros miembros de la familia
55 *Enterobacteriaceae*, tal como *Klebsiella* spp. Otros promotores adecuados incluyen: *rpJ* (proteína de la subunidad ribosomal grande; promotor de resistencia moderada); *tac* (híbrido *lac/trp* artificial; promotor fuerte) y *rnnB* (promotor génico de ARN ribosomal; promotor muy fuerte). Las secuencias de estos últimos promotores se muestran a continuación:



En las etapas adicionales opcionales que se han expuesto anteriormente:

- 5 - el grupo de mutantes puede comprender al menos $0,5 \times 10^5$ mutantes, por ejemplo, al menos 1×10^5 mutantes;
- el grupo de mutantes puede comprender al menos 5×10^5 mutantes;
- el grupo de mutantes puede comprender al menos 1×10^6 mutantes;
- el grupo de mutantes puede comprender de $0,5 \times 10^6$ a 2×10^6 mutantes;
- 10 - el grupo de mutantes puede comprender aproximadamente 1×10^6 mutantes;
- la transformación con el transposón en la etapa (b) puede producir una tasa de inserción de al menos un transposón por 50 pares de bases de ADN bacteriano, al menos un transposón por 30 pares de bases de ADN bacteriano, al menos un transposón por 25 pares de bases de ADN bacteriano, al menos un transposón por 15 pares de bases de ADN bacteriano o al menos un transposón por 10 pares de bases de ADN bacteriano;
- 15 - el ADN bacteriano de la etapa (b) puede ser ADN genómico, ADN plasmídico, o una mezcla de ADN genómico y plasmídico;
- el transposón mutagénesis de la etapa (a) puede producirse *in vivo* o *in vitro*;
- la bacteria puede ser una bacteria Gram-positiva;
- 20 - la bacteria puede seleccionarse entre *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Neisseria gonorrhoeae*;
- la bacteria puede ser una bacteria Gram-negativa;
- la bacteria puede seleccionarse entre: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, cepas ST131 de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* y *Neisseria gonorrhoeae*;
- 25 - las bacterias pueden cultivarse a partir del grupo de mutantes en la etapa (b) inoculado medio de crecimiento con 10^7 a 10^9 , por ejemplo, aproximadamente 10^8 , ufc del grupo de mutantes;
- las bacterias pueden cultivarse a partir del grupo de mutantes en la etapa (b) en presencia de antibiótico a una concentración de aproximadamente 0,5, aproximadamente 1 y aproximadamente $2 \times \text{MIC}$ para producir al menos tres cultivos de ensayo;
- 30 - la distribución de inserciones de Tn_A entre cultivos de ensayo puede compararse por secuenciación del ADN adyacente o cerca del sitio de inserción del Tn_A ;
- la secuenciación del ADN adyacente o cerca del sitio de inserción del Tn_A puede comprender la amplificación selectiva de uniones de transposón-ADN bacteriano;
- 35 - la secuenciación puede comprender bioquímica de secuenciación por síntesis (SBS);
- pueden secuenciarse aproximadamente 25, 50, 75, 100 o más de 100 pares de bases de ADN adyacente o cercano al sitio de inserción Tn_A ; y/o
- el ADN secuenciado puede estar 5' y/o 3' con respecto al sitio de inserción del Tn_A .

40 (b) Tn-seq

El método de la divulgación opcionalmente puede comprender adicionalmente las etapas de análisis Tn-seq como se describe, por ejemplo, en Gawronski y col. (2009) PNAS 106: 16422-16427; Goodman y col. (2009) Cell Host Microbe 6: 279-289; Langridge y col. (2009) Genome Research 19: 2308-2316 o Gallagher y col. (2011) mBio 2(1): e00315-10. Cuando se usa en combinación con el análisis Tn-seq, la divulgación puede identificar adicionalmente: 45 (a) genes esenciales; (b) genes ventajosos (pero no esenciales) para el crecimiento; (C) genes desventajosos para el crecimiento en condiciones particulares; y (d) genes implicados en conferir tolerancia a ciertas condiciones (genes esenciales "-específicos de nicho"), además de genes esenciales que sirven como dianas antibióticas.

50 Ejemplificación

La invención se describirá ahora con referencia a Ejemplos específicos. Estos son simplemente ejemplares y

únicamente para fines ilustrativos: no pretenden limitar de ningún modo el alcance del monopolio reivindicado o la invención descrita. . Estos ejemplos constituyen el mejor modo contemplado actualmente para la práctica de la invención.

5 Etapa 1: Producción de clones mutantes resistentes a antibióticos (mutantes Ab^R)

La MIC del antibiótico a ensayar se determina para la bacteria de interés. Después, se genera la insensibilidad relativa bacteriana al antibiótico por cualquiera de los siguientes métodos:

10 *Método 1*

Las bacterias se cultivan en cultivos de 100 ml a través de pases seriados en concentraciones de antibióticos de MIC 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 y 32x hasta que se seleccionan bacterias que crecen en concentraciones de antibiótico significativamente más altas que en los cultivos de partida de tipo silvestre.

15

Método 2

Las bacterias cultivadas en fase logarítmica se cosechan y se suspenden de nuevo a diferentes densidades celulares (es decir, 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} y 1×10^{11} células/ml) en caldo que contenía concentraciones antibióticas de 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 y 32x MIC antes de sembrarse en placas de agar que contenían las mismas concentraciones antibióticas. Los clones bacterianos con sensibilidad reducida a los antibióticos tienen su perfil de resistencia confirmado por un crecimiento adicional a altas concentraciones antibióticas.

Varios clones insensibles a los antibióticos diferentes, generados usando el Método 1 o el Método 2, o tanto el Método 1 como el Método 2, se seleccionan entonces para la mutagénesis de transposones y cada uno crecieron por separado en caldo TY 2x, con concentraciones de mantenimiento de antibiótico a una OD₆₀₀ de 0,3-0,5. Después, las células se recogieron y se lavaron tres veces en 1/2 de volumen de cultivo original de glicerol al 10 % y se suspendieron de nuevo en 1/1000 de volumen de cultivo original de glicerol al 10 % y se almacenaron a -80 °C.

30 Etapa 2: Preparación de transposomas

El ADN de transposón (EZ-Tn5 < R6K_{Yori}/KAN-2>) se amplifica usando los oligonucleótidos 5'-CTGTCTCTTATACACATCTCCCT y 5'-CTGTCTCTTATACACATCTCTTC con Pfu Ultra Fusion II, (Stratagene). Después, el amplicón resultante se fosforila usando polinucleótido cinasa (New England Biolabs). Después, se incuban doscientos nanogramos de este ADN con EZ-Tn5 transposasa (Epicenter Biotechnologies) a 37 °C durante 1 h y después se almacenó a -20 °C a una concentración de 20 ng/μl.

Etapa 3: Preparación de genes esenciales que comprenden vectores

40 Se hace un plásmido auto-replicante bacteriano que contiene el gen con resistencia a ampicilina que contiene los genes esenciales de tipo silvestre identificados usando datos obtenidos a partir de un análisis Tn-seq anterior realizado usando TraDIS (véase Langridge y col. (2009) Genome Research 19: 2308-2316) o datos publicados. El ADN plasmídico purificado se diluye a 20 ng/μl y se almacena a -80 °C.

45 Etapa 4: Producción de un grupo mutante Tn:Ab^R merodiploide

Se prepara un grupo mutante Tn:Ab^R merodiploide a partir de cada uno de los varios clones insensibles a los antibióticos diferentes. En cada caso:

50 Se mezclan sesenta microlitros de células mutantes Ab^R (almacenadas previamente a -80 °C en la Etapa 1) con 0,2 μl (4 ng) de transposomas (como se preparan en la Etapa 2) y 1 μl (20 g) del vector de expresión (como se prepara en la Etapa 3) y se electrotransformaron en una cubeta de ranura para electrodos de 2 mm usando un Bio-Rad GenePulser II ajustado a 2,4 kV, 25 μF, y 200 Ω.

55 Las células transformadas se suspendieron de nuevo en 1 ml de medio SOC (Invitrogen) y se incubaron a 37 °C durante 2 h y después se extendieron en L-agar complementado con 50 mg/ml de ampicilina y 7,5 mg/ml de kanamicina.

Después de una noche de incubación a 37 °C, el número de colonias en varias placas se estima contando una parte

de ellos, y a partir de éste se estima el número total de colonias en todas las placas de forma conservadora. Las colonias resistentes a kanamicina/ampicilina se cosechan mediante resuspensión en agua desionizada esterilizada usando un esparcidor bacteriológico.

5 Las células resuspendidas de 10-20 electroporaciones se agruparon entonces para crear un grupo de mutantes de transposón Ab^R merodiploides (mutantes Tn:Ab^R) estimados para incluir más de 1 millón de mutantes de transposón. La eficiencia de la transformación usando esta técnica disminuye según aumenta el tamaño del plásmido de expresión, lo que significa que pueden requerirse más de 20 electroporaciones para plásmidos de expresión muy grandes.

10

La conjugación es un método alternativo a la transformación para la introducción de ADN en células bacterianas. La conjugación puede usarse para introducir un ADN vector que comprende el transposón mencionado en la Etapa 2, y un ADN vector que comprende uno o más genes esenciales mencionados en la Etapa 3. Las cepas donantes y receptoras se mezclan, ya sea por estriado cruzado en medio de crecimiento sólido o mediante la mezcla de volúmenes apropiados de cultivos de caldo líquido, que pueden ser de 0,5 ml, de las cepas donantes y receptoras. Después de la incubación durante varias horas, que puede ser de 1 hora a 16 horas a una temperatura apropiada, que puede ser la temperatura ambiente (20-24 °C), 30 °C o 37 °C, las bacterias se propagan en el medio de crecimiento sólido complementado con un antibiótico que selecciona el ADN donado y un antibiótico que selecciona la cepa bacteriana receptora. La temperatura de incubación para la conjugación se determina según el ADN que se introduce: una temperatura inferior es apropiado para el ADN que comprende el transposón si la transposición del transposón es óptima a esta temperatura. Las cepas adecuadas que pueden actuar como donante en la conjugación incluyen la cepa de *E. coli* SM10λ*pir* que lleva el gen *pir* para mediar la replicación de cualquier vector de ADN que comprenda el origen de replicación *oriR6K*, tal como un vector de ADN que comprende el transposón, y también lleva funciones de transferencia del plásmido RP4 que media la transferencia de cualquier ADN vectorial que comprende el origen de movilización *mobRP4*.

Etapa 5: Determinación de gen o genes de diana antibiótica

Se preparan cuatro cultivos de 100 ml de medio de caldo, dos de los cuales se complementan con el antibiótico a una concentración de 1 a 4 x MIC (esto depende de la insensibilidad un antibiótico del clon bacteriano original). Suponiendo una biblioteca de mutantes de transposón de 1 millón de mutantes, se usan ~10⁸ - 10⁹ ufc del grupo de mutantes Tn:Ab^R merodiploides de la Etapa 4 para inocular cada cultivo.

Los cultivos se dejan crecer hasta la fase estacionaria y las células se recogen para la extracción del ADN genómico. También se preparan cultivos frescos y se inoculan con 10⁸ - 10⁹ ufc de los primeros cultivos. Estos se dejan crecer hasta la fase estacionaria y las células se recogen para la extracción del ADN genómico. El ADN genómico se secuencian usando el método TraDIS (véase, Langridge y col. (2009) Genome Research 19: 2308-2316) para obtener lecturas de secuencia iniciadas a partir de los sitios de inserción de transposón.

Después, las lecturas de secuencia se mapean con respecto a la secuencia genómica bacteriana y se comparan con la anotación genómica para determinar el número de lecturas de secuencia que mapea cada gen para los 4 cultivos (2 de ensayo y 2 de control). La comparación de los conjuntos de datos de control entre sí y de los conjuntos de datos de ensayo entre sí indica el grado de variación experimental. La comparación de los conjuntos de datos de control con los conjuntos de datos de ensayo muestra una reproducibilidad experimental e indica el gen o genes dirigidos por el antibiótico. Las lecturas de secuencia IlluminaTM de la inserción de transposones dentro del gen o genes de dianas antibióticas del gen esencial tendrán lugar en células cultivadas sin antibiótico, pero no en células cultivadas en antibiótico.

Los genes con resistencia antibiótica, identificados usando una biblioteca TraDIS "estándar" de tipo silvestre cultivados en concentración antibiótica subóptima pueden excluirse como genes de dianas antibióticas potenciales (véase a continuación).

Si en lugar de usar un plásmido de complementación que contenga todos los genes esenciales, se usan plásmidos que contengan colecciones específicas de genes esenciales o fragmentos cromosómicos, entonces se requiere más deconvolución estadística bioinformática para la identificación de dianas antibióticas. La identidad putativa de los genes de complementación y los genes de dianas antibióticas se determinará a partir de análisis detallados de densidades de lectura de transposón con y sin antibiótico.

Exclusión de los genes con resistencia antibiótica

Puede usarse secuenciación de sitio de inserción dirigida de transposón convencional (TraDIS - véase Langridge y col. (2009) *Genome Research* 19: 2308-2316) para identificar genes con resistencia antibiótica que no son esenciales para el crecimiento en condiciones normales, pero que confieren tolerancia al antibiótico (es decir, una clase de genes esenciales "específicos de nicho" analizados en Langridge y col. (2009)). Esto permite la eliminación de genes con resistencia a antibióticos de los genes de dianas antibióticas candidatos, como se describe a continuación.

La MIC del antibiótico a ensayar se determina para la bacteria de interés. Se preparan cuatro cultivos de 100 ml de medio de caldo, dos de los cuales se complementan con el antibiótico a una concentración de 0,5 a 0,75 x MIC (es decir, justo por debajo de MIC). Suponiendo un grupo de mutantes de transposón de 1 millón de mutantes, se usan 10^8 - 10^9 ufc del grupo para inocular cada cultivo. Los cultivos se dejan crecer hasta la fase estacionaria y las células se recogen para la extracción del ADN genómico. También se preparan cultivos frescos y se inoculan con 10^8 - 10^9 ufc a partir de los primeros cultivos. Estos se dejan crecer hasta la fase estacionaria y las células se recogen para la extracción del ADN genómico. El ADN genómico se secuencía usando la plataforma Illumina™ que incorpora la modificación TraDIS para obtener lecturas de secuencia iniciadas a partir de los sitios de inserción de transposones. Después, las lecturas de secuencia se mapean con respecto a la secuencia genómica bacteriana y se comparan con la anotación genómica para determinar el número de lecturas de secuencia que mapean cada gen para los 4 cultivos (2 de ensayo y 2 de control).

La comparación de los conjuntos de datos de control entre sí y de los conjuntos de datos de ensayo entre sí indica el grado de variación experimental. La comparación de los conjuntos de datos de control y de datos de ensayo muestra la reproducibilidad experimental e indica los genes que están implicados en la resistencia.

La figura 1 muestra los resultados de un estudio piloto para identificar genes que contribuyen a la resistencia a la ciprofloxacina en *Salmonella Typhi*. El gráfico incluye datos para cada gen no esencial en el genoma de la bacteria. La biblioteca de inserción de transposones se cultivó en 4 condiciones: 2 cultivos de control (sin antibiótico) y 2 cultivos cada uno con una concentración sub-IMIC de ciprofloxacina. Cada punto representa un gen y cada gen se representa 3 veces (ctrl1 v ctrl 2 y CIP1 v CIP2 = negro, e indica el grado de variación experimental; CIP promedio - ctrl promedio = gris; los puntos grises que se representan más allá del conjunto de puntos de control de color negro representan genes para los que los datos muestran una diferencia significativa). Estas comparaciones proporcionan una medida de la cantidad de variación experimental. Los puntos grises son un promedio de los datos de control en comparación con los datos de ensayo. En la figura 1, los puntos de color gris por debajo del grupo diagonal de puntos de color negro son genes que contribuyen a la resistencia. Cuanto más lejos del grupo de color negro están los puntos grises, más significativos son los datos. Los genes que se sabe que contribuyen a la resistencia a la ciprofloxacina en *Salmonella* se encuentran en esta región del gráfico, así como los genes que no se sabía previamente que contribuían a la resistencia. Los puntos de color gris por encima del grupo de color negro son genes que contribuyen a la sensibilidad. De nuevo, los genes que se sabe que contribuyen a la sensibilidad, se encuentran en esta región del gráfico, y estos datos identifican genes que no se sabía previamente que contribuían a la sensibilidad. En general, los datos son suficientemente claros para no requerir un análisis estadístico.

Equivalentes

La anterior descripción detalla las presentes realizaciones preferidas de la presente invención. Se esperan numerosas modificaciones y variaciones en la práctica de las mismas por los expertos en la técnica tras la consideración de estas descripciones. Estas modificaciones y variaciones pretenden incluirse dentro de las reivindicaciones adjuntas en las mismas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un gen esencial que sirve como una diana antibiótica en una bacteria, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 (a) generar un mutante resistente a antibióticos de dicha bacteria mediante un método que comprende la etapa de seleccionar el crecimiento en presencia de dicho antibiótico para producir un clon del mutante resistente a antibióticos (mutante Ab^R);
- 10 (b) transformar el mutante Ab^R con: (i) una o más copias de tipo silvestre de dicho gen esencial de dicha bacteria; y (ii) un transposón que inactiva por inserción el ADN bacteriano, para producir un grupo de transposones mutantes que son merodiploides para dichos uno o más genes esenciales;
- 15 (c) cultivar bacterias del grupo merodiploide en presencia de diferentes cantidades de dicho antibiótico para producir dos o más cultivos de ensayo en los que las inserciones de transposones en dicho gen esencial que sirve como una diana antibiótica se representan en condiciones no selectivas, es decir, cuando una copia de tipo silvestre del gen esencial complementa la copia mutante activada por inserción del mismo, pero no en condiciones selectivas, es decir, cuando una copia de tipo silvestre del gen esencial no complementa la copia mutante activada por inserción del mismo; y
- 20 (d) comparar la distribución de las inserciones de transposones entre cultivos de ensayo para identificar un gen esencial putativo que sirve como una diana de dicho antibiótico en dicha bacteria.
2. El método de la reivindicación 1, en el que:
- (a) el grupo merodiploide comprende: (i) al menos $0,5 \times 10^5$ mutantes, por ejemplo, al menos 1×10^5 mutantes; (ii) al menos 5×10^5 mutantes; (iii) al menos 1×10^6 mutantes; (iv) de $0,5 \times 10^6$ a 2×10^6 mutantes; o (v) aproximadamente 1×10^6 mutantes; y/o
- 25 (b) la transformación con el transposón en la etapa (b) produce una tasa de inserción de al menos: (i) un transposón por 50 pares de bases de ADN bacteriano; (ii) un transposón por 30 pares de bases de ADN bacteriano; (iii) un transposón por 25 pares de bases de ADN bacteriano; (iv) un transposón por 15 pares de bases de ADN bacteriano; o (v) un transposón por 10 pares de bases de ADN bacteriano.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ADN bacteriano de la etapa (b) es: (a) ADN genómico; o (b) ADN plasmídico; o (c) una mezcla de ADN genómico y plasmídico.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el mutante Ab^R se genera por un método que comprende adicionalmente la mutagénesis de dicha bacteria antes de seleccionar el crecimiento en presencia de dicho antibiótico, opcionalmente en el que la etapa de mutagénesis es: (a) mutagénesis química; y/o
- 35 (b) mutagénesis por radiación.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la bacteria es: (a) una bacteria Gram-positiva, opcionalmente seleccionada entre *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Neisseria gonorrhoeae*; o (b) una bacteria Gram-negativa, opcionalmente seleccionada entre: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, cepas ST131 de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* y *Neisseria gonorrhoeae*.
- 45 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores: (a) en el que las bacterias se cultivan del grupo merodiploide en la etapa (c) inoculando medio de crecimiento con 10^7 a 10^9 , por ejemplo, aproximadamente 10^8 , ufc del grupo merodiploide; y/o (c) en el que, en la etapa (c) se producen al menos dos cultivos de ensayo, un cultivo en ausencia de antibiótico y un cultivo en presencia de antibiótico, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 x MIC.
- 50 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la distribución de las inserciones de transposones entre cultivos de ensayo se compara secuenciando el ADN adyacente o cercano al sitio de inserción de transposón, opcionalmente en el que: (a) la secuenciación del ADN adyacente o cercano al sitio de inserción comprende la amplificación selectiva de uniones transposón-ADN bacteriano; y/o (b) la secuenciación comprende bioquímica de secuenciación por síntesis (SBS); y/o (c) se secuencian aproximadamente 25, 50, 75, 100 o más de 100 pares de bases de ADN adyacente o cercano al sitio de inserción; y/o (d) el ADN secuenciado es 5' y/o 3' al sitio de inserción.
- 55 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente la

etapa de asignar una función esencial a dicho gen esencial putativo mediante: (a) comparación de secuencia con uno o más genes esenciales de dicha bacteria, por ejemplo, en la que dicho gen o genes esenciales se identifican por secuenciación del sitio de inserción dirigida de transposón; y/o (b) determinación de que no es gen resistente a antibióticos, por ejemplo, en el que la etapa de determinación comprende identificar un gen con resistencia antibiótica por secuenciación del sitio de inserción dirigida de transposón usando un transposón que se inactiva en la inserción.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el uno o más genes esenciales de la etapa (b) se proporcionan: (a) en ADN lineal, por ejemplo, fragmentos de ADN genómico de dicha bacteria; o (b) en un vector de expresión, opcionalmente: (i) en un vector de expresión de integración que se inserta en el cromosoma bacteriano después de la transformación; o (ii) en un vector de expresión de única copia o bajo número de copias que se mantiene de forma estable extracromosómicamente después de la transformación, por ejemplo, en el que el vector de expresión es una combinación de plásmidos que contienen fragmentos del cromosoma nativo de dicha bacteria o un cromosoma artificial bacteriano (BAC).

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que uno o más genes esenciales de la etapa (b): (a) comprenden todos o un subconjunto definido de los genes esenciales de dicha bacteria; y/o (b) comprenden al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 250 o al menos 300 genes esenciales de dicha bacteria; y/o (c) se proporcionan por un método que comprende identificar uno o más genes esenciales de dicha bacteria por secuenciación del sitio de inserción dirigida de transposón; y/o (d) se seleccionan entre los genes implicados en:

i. la división celular; y/o

ii. la replicación de ADN (por ejemplo, polimerización o superhelicidad); y/o

iii. la transcripción (por ejemplo cebado, elongación y/o terminación); y/o

iv. la traslación (por ejemplo, genes que codifican componentes ribosomales, genes implicados en el inicio, elongación y/o liberación); y/o

v. las rutas biosintéticas (por ejemplo, metabolismo de peptidoglicanos y/o ácidos grasos).

vi. Adición plasmídica (por ejemplo, mantenimiento en la bacteria de secuencias plasmídicas)

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en la etapa (b) el mutante Ab^R : (a) se transforma simultáneamente con el uno o más genes esenciales de dicha bacteria y el transposón; o (b) se transforma en primer lugar con el transposón y después con el uno o más genes esenciales de dicha bacteria; o (c) se transforma en primer lugar con el uno o más genes esenciales de dicha bacteria y después con el transposón, opcionalmente en el que en la etapa (b) el mutante Ab^R se transforma en primer lugar con un elemento extracromosómico (por ejemplo, un plásmido o BAC) que comprende: (i) uno o más genes esenciales de dicha bacteria; y(ii) una o más secuencias de repetición de transposón; y después se transforma (por ejemplo, por conjugación con una bacteria donante) con un plásmido de suministro de transposón que comprende: (i) un gen que codifica una transposasa; e (ii) sitios de reconocimiento de transposasa de repetición invertida; en el que la una o más secuencias de repetición de transposón del elemento extracromosómico confieren inmunidad de transposón contra el transposón suministrado por el plásmido de suministro de transposón.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende adicionalmente las etapas de:

(a) generar un grupo de bacterias mutantes por mutagénesis por transposones con un transposón de activación (TnA), en el que el TnA comprende un promotor de tal forma que la inserción del transposón en el ADN bacteriano aumenta la transcripción de un gen en o cerca del sitio de inserción;

(b) cultivar bacterias del grupo de mutantes en presencia de diferentes cantidades de dicho antibiótico para producir dos o más cultivos de ensayo; y

(c) comparar la distribución de inserciones de TnA entre los cultivos de ensayo para identificar un gen esencial putativo que sirve como una diana de dicho antibiótico en dicha bacteria.

FIGURA 1

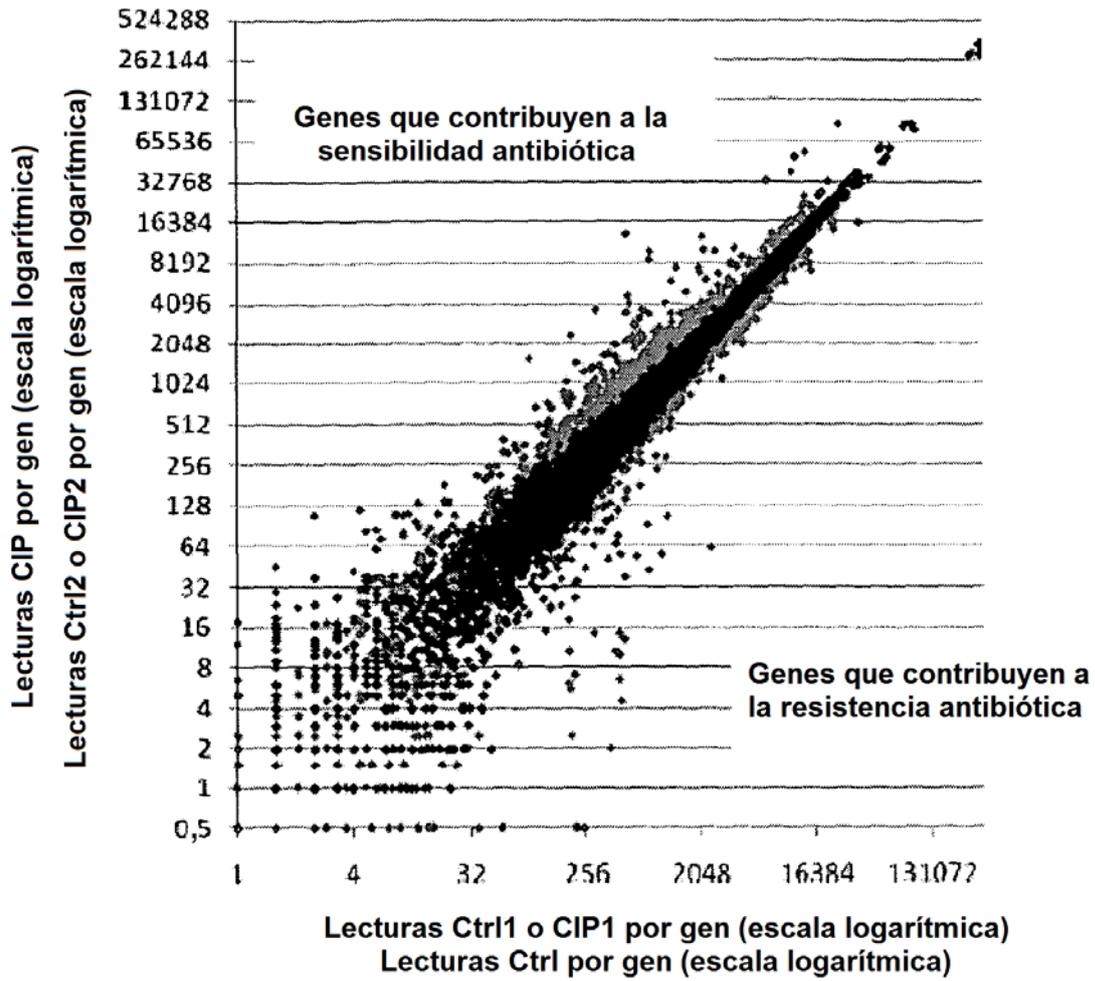


FIGURA 2

