

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 207**

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/GB2012/000402**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO2012150432**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2012 E 12723223 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2705148**

54 Título: **Método para identificar dianas de antibióticos**

30 Prioridad:

**05.05.2011 GB 201107515**

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

**21.06.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 618 207 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 de antibióticos.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para identificar dianas de antibióticos en bacterias, a métodos para identificar antibióticos y a procedimientos para producir antibióticos y composiciones farmacéuticas que comprenden dichos antibióticos.

10

Antecedentes de la invención

Existe 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 fundamental, ya que dicha información puede proporcionar acceso a un gran número de familias de fármacos novedosos relacionados funcionalmente. Por ejemplo, el descubrimiento de las proteínas de unión a la penicilina como dianas de la penicilina condujo al desarrollo de una gran familia de antibióticos, incluyendo múltiples generaciones de cefalosporinas, penicilinas y carbapenems (véase Schmid (2006) Nature Biotechnology 24(4): 419-420).

20

Se ha descrito recientemente una secuenciación in situ de inserción dirigida por transposón (TraDIS - véase Langridge y col. (2009) Genome Research 19: 2308-2316) y se ha usado 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 la concesión de 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 denominan ahora colectivamente métodos "Tn-seq".

25

30

Sin embargo, una clase importante de dianas de antibióticos son los productos génicos implicados en procesos celulares esenciales para la viabilidad en las condiciones de crecimiento utilizadas. Dichas dianas no pueden identificarse por Tn-seq (incluyendo TraDIS), puesto que las inserciones de transposones en genes esenciales (incluyendo aquellos que sirven como dianas de antibióticos) no están representadas significativamente en el grupo mutante inicial. Por lo tanto, no surgirían 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 de antibiótico.

35

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

40

Resumen de la invención

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

45

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

50

(b) desarrollar 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  $Tn_A$  entre los cultivos de ensayo para identificar un gen esencial putativo que sirve como diana de dicho antibiótico en dicha bacteria.

55

El método puede comprender adicionalmente las etapas de: 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 mutante resistente a antibióticos (mutante  $Ab^R$ ); transformar el mutante  $Ab^R$  con: (i) uno o más genes esenciales de dicha bacteria; e (ii) un transposón que inactiva por inserción el ADN bacteriano, para producir un grupo de mutantes de transposón que son merodiploides para dichos uno o más genes esenciales; desarrollar bacterias a partir del grupo merodiploide en presencia de diferentes cantidades de dicho antibiótico para producir dos o más cultivos de ensayo; y comparar la distribución de inserciones de transposones entre cultivos de ensayo para identificar un gen esencial putativo que sirve como diana de dicho antibiótico en dicha bacteria.

60

En otro aspecto, se proporciona un método de identificación de un antibiótico que comprende la identificación de un

gen esencial que sirve como una diana de dicho antibiótico.

5 En un aspecto adicional, se proporciona un proceso para producir un antibiótico que comprende la identificación de un antibiótico mediante un método que comprende identificar un gen esencial que sirve como una diana de dicho antibiótico. Tal proceso puede comprender además opcionalmente la etapa de sintetizar dicho antibiótico, y puede comprender además opcionalmente mezclar el antibiótico sintetizado con un excipiente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica.

10 El uso de un transposón activador asegura que las inserciones de transposón en genes esenciales están representadas en el grupo mutante inicial, puesto que la inserción del transposón puede ahora dar como resultado la activación génica en lugar de una inactivación por inserción. Por lo tanto, se puede estudiar el efecto de la presencia de antibiótico durante el cultivo posterior del grupo mutante en la distribución del transposón (y determinarse de este modo la identidad de la diana o dianas génicas).

15 Otros aspectos y realizaciones preferidas de la invención se definen y se describen en las otras reivindicaciones que se exponen a continuación.

#### Descripción detallada de la invención

#### 20 Definiciones y preferencias generales

25 Cuando se usan en el presente documento, y a menos que se indique específicamente lo contrario, se pretende que los siguientes términos tengan los siguientes significados además de cualquier significado más amplio (o más restringido) que los términos puedan disfrutar en la técnica:

A menos que sea requerido de otro modo por el contexto, el uso en el presente documento del singular debe leerse para incluir el plural y viceversa. El término "un" o "uno/a" utilizado en relación con una entidad debe leerse para referirse a uno o más de esa entidad. Como tal, los términos "un" (o "uno/una"), "uno o más," y "al menos uno" se usan indistintamente en el presente documento.

30 Como se usa en el presente documento, el término "comprender", o variaciones del mismo, tales como "comprende" o "que comprende", debe leerse para indicar la inclusión de cualquier número entero mencionado (por ejemplo, una función, elemento, característica, propiedad, etapa de método/proceso o limitación) o grupo de números enteros (por ejemplo, funciones, elementos, características, propiedades, etapas de método/proceso o limitaciones), pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros. Por lo tanto, tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "que comprende" es inclusiva o de composición abierta y no excluye números enteros o etapas de método/proceso adicionales o no mencionados.

40 El término gen es un término que describe una unidad hereditaria que consiste en una secuencia de ADN que ocupa una posición específica en un cromosoma o plásmido y determina una característica particular en un organismo. Un 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 tal operación; o afectar al fenotipo por algún otro mecanismo aún no definido.

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

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

La expresión *bacteria Gram-positiva* 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.

55 La expresión *bacteria Gram-positiva con bajo G+C* es una expresión de la técnica que define una clase de subclase 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.).

60 La expresión *bacteria Gram-positiva con alto G+C* es una expresión de la técnica que define una clase de subclase 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 (actinobacterias), incluyendo *Actinomyces* spp., *Arthrobacter* spp., *Corynebacterium* spp., *Frankia* spp., *Micrococcus* spp., *Micromonospora* spp., *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Propionibacterium* spp. y *Streptomyces* spp.

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*.

- 5 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, bien bajo todas las condiciones o bajo las condiciones de crecimiento utilizadas. Una importante subclase del gen esencial son aquellos productos codificantes (por ejemplo, proteínas, péptidos y polinucleótidos reguladores) que contribuyen a procesos metabólicos esenciales para la viabilidad en condiciones de crecimiento importantes (por ejemplo, y en el caso de bacterias patógenas, en condiciones que prevalecen durante la infección o la multiplicación en el huésped).

#### Antibióticos y dianas de antibióticos

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

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

- (a) la división celular;  
 (b) la replicación del ADN (incluyendo polimerización y superenrollamiento);  
 25 (c) la transcripción (incluyendo cebado, elongación y terminación);  
 (d) la traducción (incluyendo los componentes ribosómicos, inicio, elongación y liberación);  
 (e) las rutas biosintéticas (incluyendo peptidoglicano y ácidos grasos);  
 (f) la adición plasmídica;  
 (g) ensamblaje de la pared celular; y/o  
 30 (h) la integridad de las células bacterianas.

#### Bacterias para su uso en los métodos de la invención

- 35 Los métodos de la invención pueden aplicarse para identificar una diana de antibiótico en cualquier bacteria. Por lo tanto, los métodos de la invención encuentran aplicación en la identificación de dianas de antibióticos 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.

- 40 En ciertas realizaciones, los métodos de la invención se aplican para identificar una diana de antibiótico 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, complejo de *B. cepacia*); *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, serotipos 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 de antibiótico en bacterias resistentes a

múltiples fármacos, incluyendo, pero sin limitación, cepas bacterianas resistentes a la penicilina, resistentes a la metilicina, resistentes a la quinolona, resistentes a los macrólidos, y/o resistentes a la vancomicina, incluyendo, por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina, a la metilicina, a los macrólidos, a la vancomicina, y/o a la quinolona; *Staphylococcus aureus* resistente a la penicilina, a la metilicina, a los macrólidos, a la vancomicina, y/o a la quinolona; *Streptococcus pyogenes* resistente a la penicilina, a la metilicina, a los macrólidos, a la vancomicina, y/o a la quinolona; y enterococos resistentes a la penicilina, a la metilicina, a los macrólidos, a la vancomicina, y/o a la quinolona.

Por lo tanto, los métodos de la invención pueden usarse para identificar una diana de antibiótico en *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina (MRSA), por ejemplo, seleccionado de cualquiera de C-MSRA1, C-MRSA2, C-MRSA3, C-MSRA4, MRSA belga, MRSA suizo, y cualquiera de las cepas de EMRSA.

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

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

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

#### Grupos mutantes

Los métodos de la invención implican la generación de un grupo de bacterias mutantes mediante mutagénesis de transposones. El tamaño del grupo mutante afecta a la resolución del método: a medida que aumenta el tamaño del grupo, se representarán cada vez más genes diferentes con inserciones de  $Tn_A$  (y se analizarán así eficazmente). A medida que disminuye el tamaño del grupo, la resolución del método se reduce, los genes se ensayarán menos eficazmente, y cada vez más genes no se ensayarán en absoluto.

Idealmente, el grupo mutante generado en los métodos de la invención es *completo*, en el sentido de que se representan inserciones en cada gen. El número de mutantes de inserción de  $Tn_A$  (es decir, el tamaño del grupo mutante) requerido para conseguir esto depende de varios factores, incluyendo: (a) el tamaño del genoma bacteriano; (B) el tamaño medio de los genes; y (c) cualquier sesgo del sitio de inserción de  $Tn_A$ .

Con respecto a esto último, algunas áreas de genomas bacterianos atraen una baja frecuencia de inserción (especialmente regiones ricas en GC). Por lo tanto, las frecuencias de inserción y los tamaños del grupo son suficientemente grandes para asegurar que se prefieran las inserciones en las regiones refractarias a la inserción.

En general, se requiere una tasa de inserción mínima de un transposón por 25 pb para conseguir una agrupación/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  $1 \times 10^5$ , por ejemplo  $5 \times 10^5$ , preferiblemente al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  mutantes. En muchos casos,  $1 \times 10^6$  mutantes permitirán 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 mutante completo (en el sentido que se ha definido anteriormente) con el fin de devolver información útil sobre la identidad de las dianas de fármacos antibióticos. Por el contrario, pueden utilizarse tamaños de grupos menores que el grupo ideal global, con la condición de que se pueda tolerar una reducción en la resolución (y la omisión consiguiente de ensayar ciertos genes). Este puede ser el caso, por ejemplo, cuando el método está diseñado para ejecutarse iterativamente hasta que se identifica la diana: en tales realizaciones, el tamaño eficaz del grupo crece con cada iteración del método.

#### Mutagénesis de transposones

Los transposones, a menudo denominados elementos transponibles, son polinucleótidos capaces de insertar copias de sí mismos en otros polinucleótidos. 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 la secuencia, por ejemplo repeticiones invertidas cortas en cada extremo; repeticiones terminales largas (LTR) repetidas directamente repetidas en los extremos; y polyA en los extremos 3' de transcritos de ARN con extremos 5' a menudo truncados.

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 mutante, el transposón no codifica la transposasa y se proporciona en forma de un transposoma (es decir, como un complejo con la enzima transposasa), como se describe a continuación.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "transposón activador" (abreviado en lo sucesivo en el presente documento "T<sub>N</sub>A") define un transposón que comprende un promotor de tal forma que la inserción de transposones aumenta la transcripción de un gen en o cerca del sitio de inserción. Se describen ejemplos de dichos transposones 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/transposoma de activación puede introducirse en el genoma bacteriano (incluyendo el ADN cromosómico y/o plasmídico) mediante cualquiera de una amplia diversidad de procedimientos estándar que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los transposomas T<sub>N</sub>A pueden introducirse por electroporación (o cualquier otro método de transformación adecuado).

15 Preferiblemente, el método de transformación genera de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  transformantes/ng de ADN, y dichas eficiencias de transformación pueden conseguirse generalmente usando electroporación.

20 Como alternativa, la mutagénesis de transposones usando T<sub>N</sub>A puede realizarse *in vitro* y las moléculas recombinantes pueden transformarse/transfectarse en células bacterianas. En tales realizaciones, los transposomas se pueden preparar de acuerdo con un protocolo estándar mezclando la enzima transposasa disponible en el mercado con el fragmento de ADN del transposón. Los transposomas resultantes se mezclan entonces con el ADN plasmídico del plásmido de interés para permitir la transposición, a continuación el ADN se introduce en una cepa bacteriana huésped usando electrotransformación para generar un grupo de mutantes de transposón de plásmido.

25 En realizaciones en las que la mutagénesis se realiza *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, por 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 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).

#### Activación de transposones para su uso en los métodos de la invención

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

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

45 Por supuesto, es posible generar nuevos transposones insertando diferentes combinaciones de genes de resistencia a antibióticos entre los elementos IS, o insertando combinaciones de genes de resistencia a antibióticos entre los extremos del mosaico de transposón (preferidos), o alterando la secuencia polinucleotídica del transposón, por ejemplo haciendo una sustitución de base redundante o cualquier otro tipo de sustitución de base que no afecte a la transposición o las características de resistencia al antibiótico del transposón, en la región codificante de un gen de resistencia a antibióticos o en cualquier otra parte del transposón. Tales transposones se incluyen dentro del alcance de la divulgación.

50 En muchas realizaciones, se utiliza un único transposón para generar el grupo mutante. Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, el número de mutantes de inserción de Tn (es decir, el tamaño del grupo mutante) requerido para conseguir un grupo o biblioteca completa depende, entre otros, de cualquier sesgo del sitio de inserción de Tn. Por lo tanto, en los casos en los que se produce el sesgo del sitio de inserción del transposón, pueden usarse dos o más transposones diferentes con el fin de reducir o eliminar el sesgo del sitio de inserción. Por ejemplo, puede emplearse una combinación de dos transposones diferentes basados en Tn5 y Tn10.

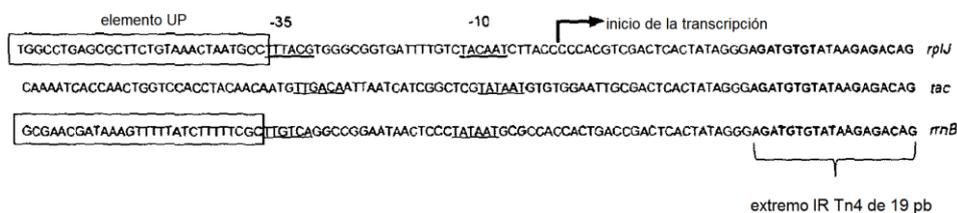
60

### Promotores para su uso en la activación de transposones

La naturaleza del promotor presente en el T<sub>nA</sub> depende de la naturaleza del transposón y del huésped bacteriano final. Generalmente, se elige un promotor eficiente orientado hacia el exterior que impulse la transcripción de alto nivel del ADN cercano o adyacente al sitio de inserción.

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-Tn5™ < R6Kyorii/KAN-2>, y dichos constructos son adecuados para el ensayo de, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. y otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, tal como *Klebsiella* spp. Otros promotores adecuados incluyen: *rpJ* (proteína de subunidad ribosómica grande; promotor de resistencia moderada); *tac* (híbrido *lac/trp* artificial; promotor fuerte) y *rnnB* (promotor génico de ARN ribosómico; promotor muy fuerte). Las secuencias de estos últimos promotores se muestran a continuación:



### Determinación de la distribución de las inserciones de T<sub>nA</sub>

La distribución de las inserciones de transposón se determina preferiblemente secuenciando el ADN bacteriano adyacente o cercano (5' y/o 3') al sitio de inserción de T<sub>nA</sub> (por ejemplo, secuenciando el ADN que comprende las uniones T<sub>nA</sub>-ADN genómico). Típicamente, se secuencian el ADN bacteriano que flanquea o está adyacente a uno o ambos extremos del T<sub>nA</sub>.

La longitud del ADN adyacente secuenciado no necesita ser extensa, y es preferiblemente relativamente corta (por ejemplo, inferior a 200 pares de bases).

Pueden usarse diversos métodos para determinar la distribución de inserción de T<sub>nA</sub> usando secuenciación de 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 la purificación por afinidad de las uniones de Tn amplificadas (Gawronski y col. (2009) PNAS 106: 16422-16427); la ligación de adaptadores en 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 portan las uniones de Tn, que sirven como plantillas para la amplificación y secuenciación después de la eliminación del ADN genómico por la digestión de la exonucleasa (Gallagher y col. (2011) mBio 2(1):e00315-10).

Se puede usar 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 la secuenciación por síntesis (SBS) son particularmente adecuadas para su uso en los métodos de la invención: por ejemplo, el sistema Illumina™ genera millones de lecturas de secuencia relativamente corta (54, 75 o 100 pb) y es particularmente preferido.

Otras técnicas adecuadas incluyen métodos basados en terminadores de colorantes reversibles. En este caso, las moléculas de ADN se unen en primer lugar a los cebadores en un portaobjetos y se amplifican de manera que se formen colonias clonales locales (amplificación de puente). Se añaden cuatro tipos de ddNTP, y los nucleótidos no incorporados se eliminan por lavado. A diferencia de la pirosecuencia, el ADN sólo puede extenderse a un nucleótido a la vez. Una cámara toma imágenes de los nucleótidos marcados por fluorescencia y después el colorante, junto con el bloqueador del terminal 3' se elimina químicamente del ADN, permitiendo el siguiente ciclo.

Otros sistemas capaces de leer secuencias cortas incluyen las tecnologías SOLiD™ e Ion Torrent (ambas vendidas por Applied Biosystems™). La tecnología SOLiD™ emplea la secuenciación mediante ligación. Aquí, un grupo de todos los oligonucleótidos posibles de una longitud fija se etiquetan de acuerdo con la posición secuenciada. Los oligonucleótidos se hibridan y se ligan; la ligación preferente por ADN ligasa para la correspondencia de las secuencias da como resultado una señal informativa del nucleótido en esa posición. Antes de la secuenciación, el ADN se amplifica mediante PCR en emulsión. El sedimento resultante, conteniendo cada una únicamente copias de la misma molécula de ADN, se deposita sobre un portaobjetos de vidrio. El resultado son secuencias de cantidades

y longitudes comparables a la secuenciación de Illumina.

Ion Torrent Systems Inc. ha desarrollado un sistema basado en el uso de la química de secuenciación estándar, pero con un novedoso sistema de detección basado en semiconductores. Este método de secuenciación se basa en la detección de iones de hidrógeno que se liberan durante la polimerización del ADN, en oposición a los métodos ópticos usados en otros sistemas de secuenciación. Un micropocillo que contiene una cadena de ADN plantilla a secuenciar se satura con un único tipo de nucleótido. Si el nucleótido introducido es complementario al nucleótido plantilla principal, se incorpora en la hebra complementaria en crecimiento. Esto provoca la liberación de un ión de hidrógeno que desencadena un sensor de iones hipersensible, lo que indica que se ha producido una reacción. Si las repeticiones de homopolímero están presentes en la secuencia plantilla, se incorporarán múltiples nucleótidos en un único ciclo. Esto conduce a un número correspondiente de hidrógenos liberados ya una señal electrónica proporcionalmente más alta.

#### Evaluación funcional de genes esenciales putativos

El gen esencial putativo identificado mediante la comparación de la distribución de inserciones de  $Tn_A$  entre los cultivos de ensayo puede caracterizarse adicionalmente mediante diversas técnicas que evalúan, directa o indirectamente, su función. De esta manera, se puede asignar definitivamente una función esencial a dicho gen esencial putativo.

Las técnicas adecuadas incluyen bioinformática, donde la secuencia (completa o parcial) del gen esencial putativo se usa para interrogar las bases de datos de secuencias que contienen información de la bacteria ensayada y/u otras especies con el fin de identificar 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 de bioinformática adecuados se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen el programa Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico (BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y 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 genes esenciales que se ha construido 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 de resistencia a antibióticos. Por ejemplo, la secuencia (completa o parcial) del gen esencial putativo se usa para interrogar bases de datos de secuencias que contienen información de secuencia de genes previamente identificados como genes de resistencia a antibióticos usando los métodos Tn-seq descritos, 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. Los genes de resistencia a antibióticos pueden identificarse en tales métodos como una clase de genes específicos de nicho/condicionalmente esenciales.

A pesar de la presencia de un promotor dentro de la secuencia insertada, muchas inserciones de  $Tn_A$  interrumpirán la función del gen/ADN y permitirán la identificación de regiones de ADN esenciales/importantes, como en Tn-seq estándar (incluyendo TraDIS). Sin embargo, algunos transposones se posicionarán apropiadamente con respecto a regiones de ADN importantes específicas, por lo que la transcripción de esas regiones específicas, impulsadas por el promotor insertado, se mejora significativamente en comparación con la transcripción endógena. Mediante el crecimiento del grupo mutante en el aumento de las concentraciones de antibióticos y la repetición de la secuenciación, es posible observar cambios en el número de lecturas, lo que indica no sólo qué región del ADN contribuye a la supervivencia de los antibióticos, sino también la contribución relativa. Los niveles más altos de la transcripción de diana de antibióticos específica (conducida por los promotores insertados en el transposón) favorecerán la supervivencia bacteriana en el sitio de inserción de antibióticos y enlaces con respecto a la región de ADN por proximidad.

Para identificar la diana o dianas de antibióticos específicas, la posición del promotor insertado se puede evaluar con respecto a su contribución al aumento de la transcripción de secuencias de ADN descendentes relevantes. Un componente bioinformático matemáticamente/técnicamente directo de esta técnica permite el reconocimiento de la contribución de la secuencia promotora insertada a la transcripción del gen de la diana de antibiótico putativo. Por ejemplo, la transcripción del producto génico parcial de la diana de antibiótico puede ser suficiente para conferir

resistencia a los antibióticos y el análisis bioinformático permitirá una explicación. Por ejemplo, el transcrito génico parcial puede todavía codificar suficiente información para permitir la traducción de una proteína esencial truncada, pero funcional. La bioinformática permitirá que se consideren los efectos de la lectura transcripcional a través de los genes situados aguas abajo del gen adyacente al transposón insertado, donde no hay ninguna secuencia definida de terminación de la transcripción de ARN.

Por ejemplo, un transposón/promotor aguas arriba de los genes A, B y C puede generar una transcripción policistrónica de los tres genes (AC), aguas arriba de B, una transcripción policistrónica de los genes B y C, y aguas arriba de C sólo el gen C. Si las lecturas de los dos primeros transposones fueran altas y la tercera baja en antibióticos, entonces la diana antibiótica sería el gen B.

#### Métodos analíticos auxiliares

Los métodos de la invención encuentran aplicación particular en casos donde la diana del antibiótico se sobreexpresa hasta un nivel en el que contribuye y tiene una función significativa en la cinética de unión al antibiótico en los niveles usados para la deconvolución de la diana. Por lo tanto, los métodos son ideales para dianas de antibióticos donde el antibiótico se une y altera la función de una macromolécula monomérica. Sin embargo, la sensibilidad puede reducirse en los casos donde la diana del antibiótico está disponible sólo en un complejo ternario, donde la diana adicional suministrada por sobreexpresión puede no funcionar como un colector eficaz y, por lo tanto, alterar el efecto del antibiótico.

Por lo tanto, en algunas circunstancias, los métodos de la invención pueden usarse junto con otras técnicas complementarias para identificar genes esenciales, condicionalmente esenciales, no esenciales y/o esenciales que sirven como dianas para antibióticos, como se describe a continuación:

#### (a) Secuenciación complementada

El método de la invención puede comprender opcionalmente además 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 mutante resistente a antibióticos (mutante Ab<sup>R</sup>);
- (b) transformar el mutante Ab<sup>R</sup> con: (i) uno o más genes esenciales de dicha bacteria; e (ii) un transposón que inactiva por inserción el ADN bacteriano, para producir un grupo de mutantes de transposón que son merodiploides para dichos uno o más genes esenciales;
- (c) desarrollar bacterias a partir 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 inserciones de transposones entre cultivos de ensayo para identificar un gen esencial putativo que sirve como diana de dicho antibiótico en dicha bacteria.

El uso de grupos mutantes de transposones generados a partir de mutantes resistentes a antibióticos que son merodiploides para uno o más genes esenciales asegura que las inserciones de transposón en genes esenciales (incluyendo aquellos que sirven como dianas de antibióticos) se representan en el grupo mutante inicial, puesto que las inserciones de transposón en el gen diana del antibiótico produce fenotipos viables en condiciones no selectivas (cuando la copia de tipo salvaje 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, se pueden detectar fácilmente diferencias en la distribución del transposón después del crecimiento del grupo de mutantes merodiploides con o sin antibiótico, permitiendo la identificación de genes esenciales que sirven como dianas de antibióticos.

En las etapas adicionales opcionales que se han expuesto anteriormente:

- el grupo merodiploide puede comprender al menos  $0,5 \times 10^5$  mutantes, por ejemplo, al menos  $1 \times 10^5$  mutantes;
- el grupo merodiploide puede comprender al menos  $5 \times 10^5$  mutantes;
- el grupo merodiploide puede comprender al menos  $1 \times 10^6$  mutantes;
- el grupo merodiploide puede comprender de  $0,5 \times 10^6$  a  $2 \times 10^6$  mutantes;
- el grupo merodiploide puede comprender aproximadamente  $1 \times 10^6$  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;

- el ADN bacteriano de la etapa (b) puede ser ADN cromosómico, ADN plasmídico o una mezcla de ADN cromosómico y plasmídico, y puede comprender todo el genoma bacteriano;

- el mutante  $Ab^R$  puede generarse por un método que comprende adicionalmente mutagenizar dicha bacteria antes de seleccionar el crecimiento en presencia de dicho antibiótico;

- la etapa de mutagenización puede ser: (a) mutagénesis química; y/o (b) mutagénesis por radiación;

- la bacteria puede ser una bacteria Gram-positiva;

- la bacteria puede seleccionarse de entre *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Neisseria gonorrhoeae*;

- la bacteria puede ser una bacteria Gram-negativa;

- la bacteria puede seleccionarse de entre: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, cepas ST131 de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* y *Neisseria gonorrhoeae*;

- las bacterias pueden desarrollarse a partir del grupo merodiploide en la etapa (c) mediante la inoculación de medio de crecimiento con  $10^7$  a  $10^9$ , por ejemplo, aproximadamente  $10^8$ , ufc del grupo merodiploide;

- en la etapa (c) pueden producirse al menos dos cultivos de ensayo, uno desarrollado en ausencia de antibiótico y uno desarrollado en presencia de antibiótico (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 x CMI);

- la distribución de inserciones de transposones entre los cultivos de ensayo puede compararse mediante secuenciación del ADN adyacente o cercano al sitio de inserción de transposón;

- la secuenciación del ADN adyacente o cercano al sitio de inserción puede comprender la amplificación selectiva de uniones de transposón-ADN bacteriano;

- 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;

- el ADN secuenciado puede estar 5' y/o 3' con respecto al sitio de inserción;

- el método puede comprender adicionalmente la etapa de asignar una función esencial a dicho gen esencial putativo mediante la comparación de secuencias con uno o más genes esenciales de dicha bacteria, por ejemplo, por secuenciación del sitio de inserción dirigida de transposón;

- el método puede comprender adicionalmente la etapa de asignar una función esencial a dicho gen esencial putativo determinando que no es un gen de resistencia a antibióticos, por ejemplo, mediante un método que comprende la identificación de un gen de resistencia a antibióticos por secuenciación del sitio de inserción dirigida de transposón usando un transposón que se inactiva en la inserción;

- el uno o más genes esenciales de la etapa (b) pueden proporcionarse en un vector de expresión, en un vector de expresión integrativo que se inserta en el cromosoma bacteriano después de la transformación; en un vector de expresión de número de copia único o bajo que se mantiene de forma estable extracromosómicamente después de la transformación;

- el vector de expresión puede ser una combinación de plásmidos que contiene fragmentos del cromosoma nativo de dicha bacteria o un cromosoma artificial bacteriano (BAC);

- el uno o más genes esenciales de la etapa (b) pueden proporcionarse en ADN lineal (por ejemplo, fragmentos de ADN genómico de dicha bacteria);

- el uno o más genes esenciales de la etapa (b) pueden comprender todos o un subconjunto definido de los genes esenciales de dicha bacteria;

- el uno o más genes esenciales de la etapa (b) pueden comprender 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;

- el uno o más genes esenciales de la etapa (b) pueden proporcionarse por un método que comprende la identificación de uno o más genes esenciales de dicha bacteria por secuenciación del sitio de inserción dirigida de transposón;

- el uno o más genes esenciales de la etapa (b) pueden seleccionarse de entre los genes implicados en: la división celular; y/o la replicación de ADN (por ejemplo, polimerización o superenrollamiento); y/o la transcripción (por ejemplo, cebado, elongación y/o terminación); y/o la traducción (por ejemplo, genes que codifican componentes ribosómicos, genes implicados en el inicio, la elongación y/o la liberación); y/o las rutas biosintéticas (por ejemplo, peptidoglicano y/o metabolismo de ácidos grasos).

- en la etapa (b) el mutante  $Ab^R$  puede transformarse simultáneamente con el uno o más genes esenciales de dicha bacteria y el transposón;

- en la etapa (b) el mutante  $Ab^R$  puede transformarse en primer lugar con el transposón y después con el uno o más genes esenciales de dicha bacteria; y/o

- en la etapa (b) el mutante  $Ab^R$  puede transformarse en primer lugar con el uno o más genes esenciales de dicha bacteria y después con el transposón.

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 una inserción de transposón no deseada en los genes esenciales introducidos que puede reducir la eficiencia de la formación de merodiploides y complicar el análisis de los datos obtenidos de dichas bibliotecas.

5 Se evitan tales problemas 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 experimentos de transformación para dar una biblioteca de tamaño suficiente. Una solución alternativa aprovecha el fenómeno de la inmunidad a la transposición. En este caso, la transposición no deseada en los genes esenciales  
10 introducidos se elimina (o se reduce) incorporando secuencias finales de mosaico de transposón en ADN extracromosómico (típicamente, de plásmido o BAC) que lleva los genes esenciales usados para crear los merodiploides. Tal estrategia puede usarse conjuntamente con los transposones basados en transposones de clase II (tipo Tn3), por ejemplo, Tn3 o sus relacionados, como se describe a continuación.

15 Los sistemas de transposón adecuados para su uso en métodos que aprovechan el fenómeno de la inmunidad a la transposición (como se ha descrito anteriormente) incluyen los basados en Tn3 y sus relacionados. Por ejemplo, el plásmido de entrega del transposón pAMICS2 (véase la figura 2) contiene todo el sistema generador de transposones basado en Tn3 (incluyendo genes que codifican las enzimas de resolvasa y transposasa, TnpR y TnpA) y un origen de replicación (*oriR6K*) que está activo sólo cuando se complementa mediante el gen *pir*, evitando  
20 de este modo la propagación en las bacterias receptoras tras la transposición. El plásmido también contiene el origen de movilización *mobRP4* para permitir la transferencia desde una cepa donante adecuada mediante conjugación, lo cual es permisivo para la replicación plasmídica (es decir, contiene el gen *pir*). La propagación inadvertida del plásmido puede detectarse también por la presencia de un gen de resistencia a la tobramicina (*aacA4*).

25 Otros transposones adecuados incluyen los basados Tn3 y los transposones de tipo Tn3 (Clase II), incluyendo  $\gamma\delta$  (Tn1000), Tn501, Tn2501, Tn21, Tn917 y sus relacionados. Además, Tn10, Tn5, Tn*phoA*, Tn903, el bacteriófago Mu y los bacteriófagos transponibles relacionados. También está disponible en el mercado una diversidad de transposones adecuados, incluyendo, por ejemplo, el transposón EZ-Tn5™ < R6Kyori/KAN-2>.

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

Naturalmente, es posible generar nuevos transposones insertando diferentes combinaciones de genes de resistencia a antibióticos entre elementos IS, o insertando combinaciones de genes de resistencia a antibióticos entre extremos de mosaico de transposón (preferidos), o alterando la secuencia polinucleotídica del transposón, por  
40 ejemplo, haciendo una sustitución de bases redundante o cualquier otro tipo de sustitución de bases que no afecte a la transposición o las características de resistencia al antibiótico del transposón, en la región codificante de un gen de resistencia a antibióticos o en cualquier otra parte del transposón. Tales transposones se incluyen dentro del alcance de la invención.

45 En muchas realizaciones, se utiliza un único transposón para generar el grupo mutante. Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, el número de mutantes de inserción de Tn (es decir, el tamaño del grupo mutante) requerido para conseguir un grupo o biblioteca completa depende, entre otros, de cualquier sesgo del sitio de inserción de Tn. Por lo tanto, en los casos en los que se produce el sesgo del sitio de inserción del transposón, pueden usarse dos o más transposones diferentes con el fin de reducir o eliminar el sesgo del sitio de inserción. Por  
50 ejemplo, puede emplearse una combinación de dos transposones diferentes basados en Tn5 y Tn10.

Por lo tanto, el método de la descripción puede comprender opcionalmente además las etapas de identificar un gen (por ejemplo, un gen esencial) que sirva como una diana de antibiótico en una bacteria, comprendiendo el método  
55 las etapas de:

- (a) transformar las bacterias con un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmido o BAC) que comprende: (i) uno o más genes esenciales de dicha bacteria; e (ii) una o más secuencias de repetición de transposón, para producir un grupo de bacterias que son merodiploides para dicho uno o más genes  
60 esenciales; y
- (b) transformar los merodiploides de la etapa (a) con un plásmido de entrega de transposón que comprende: (i) un gen que codifica una transposasa y una resolvasa; e (ii) invertir los sitios de reconocimiento repetidos de la transposasa;

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

5 En este aspecto, el sistema de entrega de transposón se basa preferiblemente en Tn3, que contiene, por ejemplo, los genes *tnpA* y *tnpR* de Tn3. Se prefieren los plásmidos de entrega de transposones que además comprendan uno o más genes de resistencia a los antibióticos.

(b) Tn-seq

10 El método puede comprender opcionalmente además las etapas del 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 además: (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 la concesión de tolerancia a ciertas condiciones (genes específicos "específicos de nicho"), además de genes esenciales que sirven como dianas de antibióticos.

**Ejemplos**

20 La invención se describirá ahora con referencia a Ejemplos específicos. Estos son meramente ejemplares y con fines únicamente ilustrativos: no pretenden limitar de ninguna manera el alcance del monopolio reivindicado o la invención descrita. Estos ejemplos constituyen el mejor modo actualmente contemplado de poner en práctica la invención.

25 Reparación de bacterias por electroporación

Las bacterias se cultivan en caldo 2 x TY hasta una OD<sub>600</sub> de 0,3-0,5. Después, las células se recogen y se lavan tres veces en 1/2 de volumen de cultivo original de glicerol al 10 % y se suspenden de nuevo en 1/1000 en volumen de cultivo original de glicerol al 10 % y se almacenan a -80 °C.

30

Preparación de transposomas

35 Se amplificó ADN de transposón (un derivado de EZ-Tn5™ < R6Kγori/KAN-2> que poseía un promotor lac interno, usando los oligonucleótidos 5'-CTGTCTCTTATACACATCTCCCT y 5'-CTGTCTCTTATACACATCTCTTC con ADN polimerasa Pfu Ultra Fusion II.

(Stratagene). Como alternativa, el promotor interno *lac* se puede reemplazar por un promotor *tac* (como se ha descrito anteriormente). Después, el amplicón resultante se fosforiló usando el polinucleótido cinasa T4 (New England Biolabs). Después, se incubaron doscientos nanogramos de este ADN se incubaron con transposasa EZ-Tn5™ (Epicentre Biotechnologies) a 37 °C durante 1 h y después se almacenaron a -20 °C a una concentración de ADN de 20 ng/μl.

40

Generación de grupos bacterianos mutantes

45 Se mezclan sesenta microlitros de células (previamente almacenadas a -80 °C con 0,2 μl (4 ng) de transposomas y 1 μl (20 g) que complementan el plásmido que comprenden genes esenciales y se electrotransforman en una cubeta de separación de electrodos de 2 mm usando un Bio-Rad GenePulser II ajustado a 2,4 kV, 25 μF y 200 Ω. Las células se suspenden de nuevo en 1 ml de medio SOC (Invitrogen) y se incuban a 37 °C durante 2 h, después se propagan sobre medio de crecimiento bacteriológico de L-agar complementado con una concentración apropiada de kanamicina La concentración de kanamicina usada depende de la cepa y se determina empíricamente.

50

Después de la incubación durante una noche a 37 °C, el número de colonias en varias placas se calcula contando una proporción de ellas, y a partir de esto el número total de colonias en todas las placas se estima conservadoramente. Las colonias resistentes a la kanamicina se cosechan mediante resuspensión en agua desionizada esterilizada usando un esparcidor bacteriológico. Después, las células resuspendidas de varias electroporaciones se agrupan para crear mezclas de bibliotecas mutantes que se estima que incluyen más de 1 millón de mutantes.

55

Identificación de uno o más genes de diana de antibióticos

60

Se preparan ocho cultivos de 100 ml de medio de caldo, seis de los cuales se complementan, por duplicado, con el antibiótico de ensayo a concentraciones de 0,5, 1 y 2 x CMI. También se añade al medio cualquier inductor promotor requerido en este momento para asegurar la transcripción activa dirigida al ADN cromosómico de la secuencia del

transposón.

5 Asumiendo un grupo mutante de transposón de 1 millón de mutantes, se utilizan  $10^8$  -  $10^9$  ufc del grupo para inocular cada cultivo. Los cultivos se desarrollan hasta la fase estacionaria y las células se cosechan para la extracción de ADN genómico. También se preparan cultivos frescos y se inoculan con  $10^8$  -  $10^9$  ufc de los primeros cultivos. Estos se desarrollan hasta la fase estacionaria y las células se cosechan para la extracción de ADN genómico.

10 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 del transposón. Después, las lecturas de secuencia se correlacionan con la secuencia del genoma bacteriano y se comparan con la anotación del genoma para determinar el número de lecturas de secuencia que se asignan a cada gen para los 8 cultivos (6 de ensayo y 2 de control). La comparación de los conjuntos de datos de control entre sí y de conjuntos de datos de ensayo entre sí indica el grado de variación experimental.

15 La comparación de los datos de control con los conjuntos de datos de ensayo muestra la reproducibilidad experimental e indica el gen o genes dirigidos por el antibiótico. Las lecturas de secuencia Illumina™ de la inserción de transposón dentro del gen o genes de la diana de antibiótico de los genes esenciales aumenta en las células cultivadas con antibióticos, donde el promotor causó un aumento en esta transcripción génica específica. Además, el recuento de lectura relativo del gen o genes diana aumenta con la concentración de antibiótico utilizado.

#### 20 Exclusión de los genes de resistencia a antibióticos

25 Se puede usar la secuenciación in situ de inserción dirigida por transposón convencional (TraDIS - véase Langridge y otros (2009) Genome Research 19: 2308-2316) para identificar genes de resistencia a antibióticos que no son esenciales para el crecimiento en condiciones normales, pero que confieren tolerancia al antibiótico (es decir, una clase de los genes "específicos de nicho" analizados en Langridge y col. (2009)). Esto permite la eliminación de genes de resistencia a antibióticos de genes de diana de antibiótico candidatos, como se describe a continuación.

30 La CMI 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 CMI (es decir, justo por debajo de la CMI). Asumiendo un grupo mutante de transposón de 1 millón de mutantes, se usan  $10^8$  -  $10^9$  ufc del grupo para inocular cada cultivo. Los cultivos se desarrollan hasta la fase estacionaria y las células se cosechan para la extracción de ADN genómico. También se preparan cultivos frescos y se inoculan con  $10^8$  -  $10^9$  ufc de los primeros cultivos. Estos se desarrollan hasta la fase estacionaria y las células se cosechan para la extracción de 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 del transposón. Después, las lecturas de secuencia se correlacionan con la secuencia del genoma bacteriano y se comparan con la anotación del genoma para determinar el número de lecturas de secuencia que se asignan a cada gen para los 4 cultivos (2 de ensayo y 2 de control).

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

45 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 con ciprofloxacina subóptima. Cada punto representa un gen y cada gen se representa 3 veces (ctrl1 frente a ctrl 2 y CIP1 frente a CIP2 = negro, e indica el grado de variación experimental; CIP promedio frente a ctrl promedio = gris; los puntos grises que se representan más allá del grupo de puntos de control negro, representan genes para los cuales los datos muestran diferencias significativas). En la figura 1, los puntos de color gris debajo del grupo diagonal de puntos negros son genes que contribuyen a la resistencia. Cuanto más lejos del grupo negro estén 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 previamente no se sabía que contribuían a la resistencia. Los puntos grises por encima del grupo negro son genes que contribuyen a la sensibilidad. Una vez más, los genes que se sabe que contribuyen a la sensibilidad se encuentran en esta región de la gráfica, y estos datos identifican genes que previamente no se sabía que contribuían a la sensibilidad. Los datos son generalmente suficientemente claros para no requerir un análisis estadístico.

#### 60 Equivalentes

La descripción anterior detalla las realizaciones actualmente preferidas de la presente invención. Se espera que se produzcan numerosas modificaciones y variaciones en la práctica de las mismas por los expertos en la técnica tras

la consideración de estas descripciones. Se pretende que estas modificaciones y variaciones estén incluidas dentro de las reivindicaciones adjuntas a la presente.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un gen esencial que sirve como una diana de antibiótico en una bacteria, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 (a) generar un grupo de bacterias mutantes by mutagénesis de transposones con dos o más transposones activadores diferentes ( $Tn_A$ ), en el que cada  $Tn_A$  comprende un promotor de tal forma que la inserción de transposones en el ADN bacteriano altera la función o aumenta la transcripción de un gen en o cerca del sitio de inserción de una manera dependiente de la posición, y en el que la mutagénesis de transposones produce una tasa de inserción de al menos un transposón por 10 pares de bases de ADN bacteriano;
- 10 (b) desarrollar bacterias del grupo de mutantes en presencia de antibiótico a una concentración de aproximadamente 0,5, aproximadamente 1 y aproximadamente 2 x CMI para producir al menos tres cultivos de ensayo; y
- 15 (c) comparar la distribución de inserciones de  $Tn_A$  entre los cultivos de ensayo para identificar: (i) sitios de inserción de  $Tn_A$  que alteran la función génica esencial; e (ii) sitios de inserción de  $Tn_A$  que se sitúan de tal forma que la transcripción génica esencial se mejora de tal modo que el producto génico esencial se sobreexpresa a un nivel en el que funciona como un colector para dicho antibiótico y así altera el efecto del antibiótico sobre dicha bacteria, identificando de este modo un gen esencial putativo que es necesario para la viabilidad en todas las condiciones de crecimiento usadas en la etapa (b), y que sirve como una diana de dicho antibiótico en dicha bacteria.
- 20
2. El método de la reivindicación 1, en el que el grupo de bacterias mutantes comprende al menos  $0,5 \times 10^5$  mutantes, por ejemplo: (a) al menos  $1 \times 10^5$  mutantes; (b) al menos  $5 \times 10^5$  mutantes; (c) al menos  $1 \times 10^6$  mutantes; (d)  $0,5 \times 10^6$  a  $2 \times 10^6$  mutantes; o (e) aproximadamente  $1 \times 10^6$  mutantes.
- 25
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el ADN bacteriano de la etapa (a) es: (a) ADN cromosómico (genómico); o (b) ADN plasmídico o una mezcla de ADN cromosómico (genómico) y plasmídico.
- 30
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mutagénesis de transposones de la etapa (a) se produce *in vivo* o *in vitro*.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la bacteria es: (a) una bacteria Gram-positiva, seleccionada opcionalmente de entre *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Neisseria gonorrhoeae*; o (b) una bacteria Gram-negativa, seleccionada opcionalmente de entre:
- 35 *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, cepas ST131 de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* y *Neisseria gonorrhoeae*.
- 40
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las bacterias se desarrollan a partir del grupo de mutantes en la etapa (b) mediante la inoculación de medio de crecimiento con  $10^7$  a  $10^9$ , por ejemplo, aproximadamente  $10^8$ , ufc del grupo de mutantes.
- 45
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la distribución de inserciones de  $Tn_A$  entre los cultivos de ensayo se compara secuenciando el ADN adyacente o cerca del sitio de inserción del  $Tn_A$ .
8. El método de la reivindicación 9, en el que la secuenciación del ADN adyacente o cerca del sitio de inserción del  $Tn_A$  comprende: (a) la amplificación selectiva de uniones de transposón-ADN bacteriano; y/o (b) la bioquímica de secuenciación por síntesis (SBS), y opcionalmente en el que: (a) se secuencian aproximadamente 25, 50, 75, 100 o más de 100 pares de bases de ADN adyacente o cerca del sitio de inserción de  $Tn_A$ ; y/o (b) el ADN secuenciado está 5' y/o 3' con respecto al sitio de inserción de  $Tn_A$ .
- 50
9. 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 secuencias con uno o más genes esenciales de dicha bacteria, en el que opcionalmente, dicho gen o genes esenciales se identifican por secuenciación del sitio de inserción dirigida de transposón usando un transposón que se inactiva en la inserción; o (b) determinar que no es un gen de resistencia a antibióticos, en el que opcionalmente la etapa de determinación comprende la identificación de un gen de resistencia a antibióticos mediante la secuenciación del sitio de inserción dirigida de transposón usando un transposón que se inactiva en la inserción.
- 55
- 60
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende adicionalmente las etapas de:

5 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 mutante resistente a antibióticos (mutante Ab<sup>R</sup>); transformar el mutante Ab<sup>R</sup> con: (i) uno o más genes esenciales de dicha bacteria; e (ii) un transposón que inactiva por inserción el ADN bacteriano, para producir un grupo de mutantes de transposón que son merodiploides para dichos uno o más genes esenciales; desarrollar bacterias a partir del grupo merodiploide en presencia de diferentes cantidades de dicho antibiótico para producir dos o más cultivos de ensayo; y comparar la distribución de inserciones de transposones entre cultivos de ensayo para identificar un gen esencial putativo que sirve como diana de dicho antibiótico en dicha bacteria.

10

11. Un proceso para producir un antibiótico que comprende el método según se ha definido en la reivindicación 1.

15 12. El proceso de la reivindicación 11 que comprende adicionalmente sintetizar dicho antibiótico, y opcionalmente que comprende además mezclar el antibiótico sintetizado con un excipiente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica.

FIGURA 1

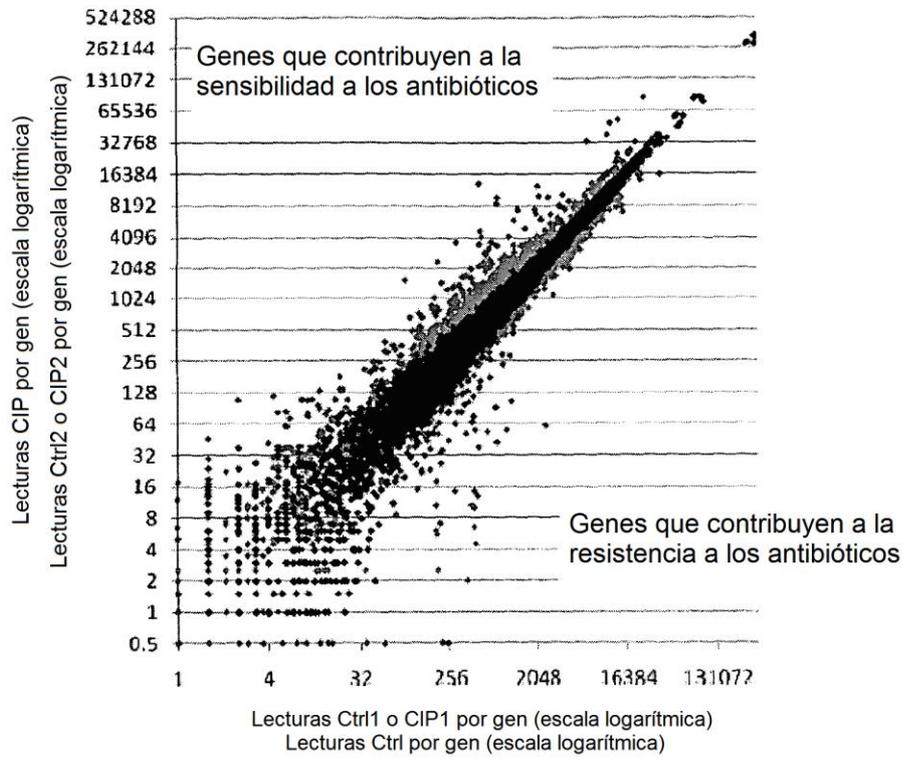


FIGURA 2

