

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 531**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2014 PCT/GB2014/051918**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14203008**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2014 E 14732629 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 3011025**

54 Título: **Composiciones de oligonucleótidos antisentido**

30 Prioridad:

21.06.2013 GB 201311057

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

28.05.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF GREENWICH (100.0%)
Old Royal Naval College Park Row Greenwich
London SE10 9LS, GB**

72 Inventor/es:

**RICHARDSON, SIMON CLIFFORD WAINWRIGHT;
DYER, PAUL DOUGLAS REMANE y
MITCHELL, JOHN CARLTON**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 714 531 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

Composiciones de oligonucleótidos antisentido

La presente divulgación se refiere a composiciones de oligonucleótidos antisentido (OAS) y en particular a composiciones y procedimientos para el suministro citosólico de oligonucleótidos antisentido (OAS). Los OAS híbridos, parte monocatenario y parte bicatenario, se proporcionan, mediante la hibridación para formar una región bicatenaria que puede unirse no covalentemente a regiones de proteínas de unión de ácidos nucleicos. De esta forma, se pueden producir complejos de OAS::proteína que facilitan el suministro de ADN antisentido en células diana. Tales complejos se pueden usar para regular negativamente la expresión génica en células.

Los oligonucleótidos antisentido se han aprobado por la FDA para su uso como antiviricos, para el tratamiento de retinitis mediada por citomegalovirus y colitis ulcerativa crónica (Roehr, 1998; Yacychyn y col., 1998). Los OAS están comprendidos de segmentos de ADN monocatenario o análogos de los mismos, que se designan para hibridarse a una transcripción de ARN mensajero (ARNm), derivada de un gen específico. Los híbridos de ARNm::OAS formados de este modo pueden degradarse mediante ARNasa H. En un organismo infectado con un virus, el material genético del virus entra en las células específicas para replicarse, un procedimiento que requiere la translación de ARNm específico del virus. Tratando una célula infectada con un oligonucleótido antisentido específico para ARNm vírico, es posible evitar la expresión de un gen vírico diana y bloquear el ciclo de vida vírico.

Un factor importante en la eficacia del tratamiento de oligonucleótido antisentido es la biodisponibilidad de los oligonucleótidos (Biroccio y col., 2003). La biodisponibilidad puede estar limitada por la incapacidad de oligonucleótidos antisentido de penetrar la membrana plasmática o el sistema de endomembrana de las células. Puesto que las dianas de oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, ARNm) están emplazados dentro del citosol de una célula, los oligonucleótidos necesitan ser capaces de atravesar membranas celulares antes de que puedan acceder al citosol.

Un modo de abordar este problema de acceso citosólico de oligonucleótidos antisentido es administrar el tratamiento localmente en lugar de sistémicamente y, en particular, administrar el oligonucleótido antisentido en un compartimento farmacocinético separado, aumentando la concentración local del oligonucleótido antisentido. Por ejemplo, un tratamiento de oligonucleótidos antisentido de retinitis mediada por citomegalovirus implica la administración de fomivirsen (Vitravene®) en un compartimento farmacocinético separado mediante inyección intravítrea. Sin embargo, el acceso citosólico, es decir, el acceso de los oligonucleótidos antisentido en su ARNm diana, sigue siendo una limitación sustancial, incluso después de la administración intravítrea (Lysik y Wu-Pong, 2003). Otros enfoques con respecto al suministro intracelular de oligonucleótidos antisentido pueden implicar: daño celular mecánico y eléctrico a la membrana celular, vehículos poliméricos y de lípidos (conocidos por desestabilidad no específicamente membranas) o vectores víricos. Sin embargo, estos enfoques y similares no han demostrado ser seguros o fiables en la clínica y no han dado como resultado (hasta la fecha) ninguna tecnología de suministro aprobada para productos antisentido en el mercado.

La presente divulgación pretende proporcionar composiciones y procedimientos para su uso en un sistema para la regulación negativa de uno o más genes dentro de una célula por medio de una novedosa disposición de una secuencia antisentido activa (por ejemplo, de ADN monocatenario) que flanquea una segunda cadena de oligonucleótidos que se solapa parcialmente que forma un sitio de unión que puede unirse a un dominio proteínico, de unión de ácidos nucleicos. Denominamos estos nucleótidos en parte monocatenarios y en parte bicatenarios, "híbridos de OAS". Inesperadamente, hemos descubierto y hemos demostrado empíricamente (datos no publicados):

1) Que los híbridos de OAS pueden mostrar un perfil de actividad antisentido equivalente con respecto al oligonucleótido antisentido monocatenario en un ensayo sin células, por ejemplo, en una concentración de OAS de 30 pMol.

2) Que los híbridos de OAS se unen a un dominio de unión de ácidos nucleicos (tal como GAL4 de *S. cerevisiae*) para formar un complejo sin requerir un agarre de afinidad policatiónico (tal como poli(L-lisina), usada previamente (Gaur y col., 2002; documento WO97/23236)) u otros procedimientos de conjugación química covalente.

3) Que si, en un complejo híbrido de OAS (por ejemplo, GAL4::OAS) el dominio de unión de ácidos nucleicos se fusiona en factor letal atenuado de dominio 1 (de *Bacillus anthracis*, es decir, LFn), es conjunto supramolecular puede pasar a través de un poro que deriva de un factor de virulencia bacteriana (PA63 de *Bacillus anthracis*). Este resulta inesperado pues se informa que el pasaje a través del poro de PA requiere el desmontaje estructural de la carga (transición globular fundida) (Zornetta y col., 2010). Para que un complejo supramolecular circule en el citosol a través del poro PA, la transición globular fundida de la carga, es decir, una transición desde una estructura ordenada a un bucle aleatorio, no tiene que tener lugar. De nuevo, esta transición se ha demostrado sin el uso de un agarre de afinidad policatiónico (tal como poli(L-lisina) (Gaur y col., 2002: documento WO97/23236)).

Es un objeto particular de la presente divulgación proporcionar una estrategia de conjugación para permitir que las composiciones de oligonucleótidos antisentido crucen una membrana celular. De esta forma, se pueden suministrar oligonucleótidos antisentido al citosol de una célula que proporciona acceso directo a dianas de ARN o ADN dentro

del citosol (tal como transcripciones de ARNm vírico) mediante la estrategia de conjugación de antisentido-a-proteína descrita.

La invención a la cual pertenece la presente memoria descriptiva se indica en las reivindicaciones adjuntas a la presente descripción.

5 En un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición de oligonucleótidos antisentido que comprende un par de oligonucleótidos antisentido, en la que los dos oligonucleótidos antisentido se hibridan para proporcionar al menos una secuencia antisentido monocatenaria y al menos una secuencia de unión a proteínas bicatenaria. Preferentemente, la composición comprende adicionalmente una proteína lanzadera (por ejemplo, LFn-GAL4 recombinante), en la que la proteína lanzadera comprende un dominio de unión de ácidos nucleicos (por ejemplo, GAL4) que reconoce la secuencia de unión de proteínas bicatenaria y en la que la proteína lanzadera está unida no covalentemente al par de oligonucleótidos antisentido.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un sistema de suministro de un oligonucleótido antisentido a través de una membrana de una célula, comprendiendo el sistema (i) un par de oligonucleótidos antisentido, comprendiendo el par una secuencia de unión de proteínas bicatenaria (por ejemplo, GAL4) y al menos una secuencia antisentido monocatenaria (como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1) y (ii) una proteína lanzadera que tiene un dominio de unión de ácidos nucleicos que es capaz de reconocer una secuencia específica (por ejemplo, CGG-N₁₁CCG) incorporada dentro de la secuencia de ácidos nucleicos de unión de proteína bicatenaria para unir no covalentemente la proteína lanzadera al par de oligonucleótidos antisentido.

15 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un procedimiento de conjugación no covalente de un oligonucleótido antisentido a una proteína lanzadera (por ejemplo, LFn-GAL4), comprendiendo el procedimiento: (i) proporcionar dos oligonucleótidos antisentido, (ii) hibridar los dos oligonucleótidos antisentido para formar un híbrido antisentido, en la que el híbrido antisentido comprende al menos una secuencia antisentido monocatenaria y al menos una secuencia de unión a proteínas bicatenaria, (iii) proporciona una proteína lanzadera que contiene un dominio de unión de ácidos nucleicos que reconoce una secuencia diana de unión de proteínas bicatenaria, y (iv) conjugar no covalentemente la proteína lanzadera al híbrido antisentido por medio del dominio de unión de ácidos nucleicos de la proteína y la secuencia de unión de proteínas del híbrido antisentido.

20 El procedimiento de conjugación y translocación de membrana no requiere el uso de agentes condensadores de ADN (policatiónicos o iónicos) (tales como poli(etilenimina) o poli(L-Lisina)) puesto que estos materiales son a menudo tóxicos y se piensa que su toxicidad se debe, en parte, a su tendencia en desestabilizar las membranas celulares (Richardson y col., 1999) (y véase Tabla 1 a continuación). En el contexto de la presente invención, una proteína lanzadera se define como una proteína que es capaz de transportar material genético a través de un poro en una membrana celular. El poro puede comprender una proteína formadora de poros, tal como PA83 o PA63 de *Bacillus anthracis*.

25 Los oligonucleótidos de la divulgación comprenden secuencias de ácido nucleico, que puede ser ADN o análogos de ADN, por ejemplo, análogos sulfonados en los que se sustituyen determinados átomos de oxígeno por azufre. Otros análogos de ADN que pueden encontrarse adecuados incluyen aquellos que se desvelan por Leumann (2002). Las secuencias pueden adjuntarse directamente entre sí o pueden conectarse mediante una secuencia de ADN que interviene, preferentemente, al menos parcialmente bicatenaria.

30 En un aspecto preferente de la divulgación realizada, la proteína lanzadera es una proteína de toxina atenuada. En particular, la proteína lanzadera puede ser dominio I de factor letal (LFn) de *B. anthracis*. Preferentemente, en la toxina atenuada, al menos un dominio de toxina, por ejemplo, uno o más de los dominios II-IV tóxicos de la toxina de proteína de factor letal de *B. anthracis*, se sustituye por un dominio de unión de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el dominio de unión de ácidos nucleicos puede ser GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae* (fusionado con LFn).

35 Ventajosamente, la composición de oligonucleótidos antisentido comprende adicionalmente una proteína formadora de poros. Preferentemente, la proteína formadora de poros es una proteína no tóxica. Una proteína formadora de poros preferente es Antígeno Protector (PA) de factor de virulencia de *B. anthracis*. En particular, la proteína formadora de poros puede ser PA83 o PA63 de *B. anthracis*.

40 En un aspecto (en el caso de dirigirse a sintaxina5 (Syn5) para la regulación negativa) uno de los oligonucleótidos incluye la secuencia antisentido de extremo 5' AATTTGTTTGTGAGGCTA 3' (SEQ ID No: 18). Cada miembro del par de oligonucleótidos antisentido comprende una de las dos cadenas complementarias que hibridan para formar la secuencia de unión de proteínas (véase Figura 1). La secuencia antisentido puede ser corriente abajo (extremo 3') o corriente arriba (extremo 5') de la secuencia de unión de proteínas (o ambas, si hay más de una secuencia antisentido en el híbrido resultante) (véase, Figura 1a).

45 En una realización, la secuencia de unión de proteínas es CGG-N₁₁-CCG en la que "N" es cualquier nucleótido que comprenda una base de purina o pirimidina. De forma adecuada, la secuencia de unión de proteínas es 5' **CGGCTGCTCTGATGCCG** 3' (SEQ ID No: 19).

50 Ventajosamente, la composición de oligonucleótidos antisentido comprende pares de oligonucleótidos que hibridan para formar una secuencia de unión de proteínas que incluye la secuencia: 5' CGGCATCAGAGCAGCCG 3' (SEQ ID No: 20). Ejemplos de tales secuencias son las SEQ ID Nos 9, 11 y 13 que se muestran a continuación (Ejemplo 4).

60 En un aspecto, el oligonucleótido comprende adicionalmente una secuencia flanqueantes entre la secuencia de unión de proteínas y la secuencia antisentido (véase Figura 1a).

Ventajosamente, los oligonucleótidos usados en la presente invención pueden sulfonarse, aumentando, de este modo, su estabilidad. En oligonucleótidos sulfonados, uno o más átomos de oxígeno que no se entrecruzan en la cadena de oligonucleótidos se puede sustituir por átomos de azufre. La sulfonación se puede efectuar mediante diversos procedimientos conocidos, por ejemplo, mediante el uso del Reactivo de Beucage (3H-1,2-benzoditiol-3-ona-1,1,-dióxido) (Cieslak y col., 2005). Otros modos de aumentar la estabilidad de los oligonucleótidos que pueden emplearse en la invención son: por ejemplo, los que se desvelan en Leumann (2002).

La presente divulgación también proporciona un procedimiento *in vitro* de regulación negativa de la expresión de un gen diana en el citosol de una célula suministrando un oligonucleótido antisentido a través de una membrana de la célula usando una composición de oligonucleótidos antisentido tal como se ha descrito anteriormente.

Un aspecto alternativo de la presente divulgación es una composición de oligonucleótidos antisentido tal como se ha descrito anteriormente para su uso en un procedimiento de regulación negativa de la expresión de un gen a partir de Virus de Papiloma Humano (VPH) en una célula epitelial cervical humana (véase, Figura 5 y Ejemplo 7).

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona una composición de oligonucleótidos antisentido tal como se ha descrito anteriormente como un tratamiento potencial o profilaxis de cáncer, en particular, cánceres provocados por el virus del papiloma humano (VPH), incluido cáncer cervical y cánceres orales.

Muchas toxinas vegetales y bacterianas (factores de virulencia) han evolucionado para suministrar una toxina, en la forma de un dominio proteico catalíticamente activo macromolecular, al citosol de una célula. Ejemplos incluyen la toxina del cólera (Sandvig y col., 2005), toxina de ricino (Sandvig y col., 2010) y toxina de ántrax (Gaur y col., 2002). Estos agentes se conocen por funcionar *in vivo*, provocando morbilidad y mortalidad del ser humano.

Los presentes inventores han preparado una versión atenuada del factor letal (LFn) de *Bacillus anthracis*, en la que los dominios II-IV de tipo silvestre (responsables de la actividad tóxica catalítica) se han retirado usando PCR recombinante. Estos dominios (II-IV) se han sustituido posteriores con un dominio de unión de ácidos nucleicos tal como GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae*. Todo esto se conoce en la técnica (Gaur y col., 2002). Los inventores han demostrado que GAL4 puede unirse, indirectamente, para activar oligonucleótidos antisentido en condiciones adecuadas, es decir, cuando dos oligonucleótidos adecuados se hibridan juntos para formar un híbrido que contiene una secuencia antisentido monocatenaria y una secuencia de unión de proteína bicatenaria (DS). Los inventores han demostrado además que el complejo completo (LFn-GAL4::OAS) puede usarse para translocar oligonucleótidos antisentido en el citosol de una célula mediante su interacción con otra proteína, PA83. Significativamente, los procedimientos y materiales empleados por los inventores para generar el complejo oligonucleótido-proteína antisentido completo significan que los agentes de condensación o agarres de afinidad de policones considerados hasta ahora como necesarios para la formación de complejos de ADN en la técnica (tal como poli(L-Lisina) (Gaur y col., 2002; documento WO97/23236), que son tóxicos y se conocen por desestabilizar las membranas (Richardson y col., 1999)) no se requieren.

Un aspecto preferente de un sistema de acuerdo con la presente divulgación proporciona una secuencia de oligonucleótido antisentido monocatenaria de extremo 3' y/o extremo 5' con respecto a una secuencia de unión de proteínas bicatenaria (DS). Las proteínas tales como PFn pueden usarse junto con proteínas formadoras de poros, por ejemplo, PA83. PA83 tiene la capacidad de potenciar la translocación de membrana de LFn. La interacción entre LFn y PA83 se describe en (Krantz y col., 2005) aunque se ha documentado que requiere la transición globular fundida de la carga durante la translocación de poros. Ahora hemos demostrado que es posible usar un conjunto supramolecular como carga y que una secuencia antisentido asociada con ese conjunto supramolecular puede translocarse en el citosol. Esto no podría haberse predicho.

Los inventores han desarrollado adicionalmente el sistema para usar oligonucleótido hibridado que contiene una secuencia de unión de LFn-GAL4 bicatenaria y una secuencia antisentido monocatenaria saliente del extremo 3' y/o extremo 5', que han demostrado no ser menos eficaces que la secuencia antisentido (nucleótido monocatenario) sin ninguna secuencia flanqueante en concentraciones de oligonucleótidos antisentido (OAS) por encima de 30 pMol. El complejo desarrollado por los inventores se puede usar como un sistema de conjugación de oligonucleótidos antisentido para facilitar el suministro citosólico de oligonucleótidos antisentido sin una unión covalente entre los oligonucleótidos y la proteína de LFn-GAL4. La presente invención proporciona una herramienta útil para la investigación *in vitro* así como una base para una composición farmacéutica de oligonucleótidos antisentido y una parte importante de la metodología de suministro de cualquier terapia antisentido adecuada. En particular, la presente invención puede formar la base de una composición antivírica antisentido para el tratamiento de células epiteliales cervicales infectadas por UPV.

Se ha demostrado la dimerización de la proteína de LFn.GAL4 en respuesta a la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos de reconocimiento de proteínas bicatenaria adyacente a la secuencia antisentido usando una difusión de neutrones a bajo ángulo (SANS) (véase Ejemplo 5). El Ejemplo 5 muestra que la proteína LFn-GAL4 forma complejos de alto peso molecular (radio de giro de proteína (R_g)) que se expande desde aproximadamente 5 nm a 25 nm cuando se añaden las composiciones de oligonucleótidos híbridos de la invención.

Para someter a ensayo un sistema de tres componentes de acuerdo con la presente invención, los inventores produjeron inicialmente un prototipo. La capacidad del sistema en regular negativamente genes se evaluó en células epiteliales humanas (Hela). El compuesto de LFn-GAL4::oligonucleótido, cuando se mezcló con PA83 facilita la regulación negativa del gen específico, seleccionado (véase, Ejemplo 6), que se corresponde con la secuencia

antisentido. Haciendo referencia al Ejemplo 6, esta ilustra la regulación negativa de la proteína de Sintaxina5 mediante transferencia de Western e inmunodetección (Suga y col., 2005). La especificidad génica (así como el control del número celular) se enfatiza adicionalmente normalizando los niveles de expresión génica diana con respecto a los niveles de expresión de un gen "guardián" tal como Derlina1 y mediante la inclusión de controles "sin sentido" (véase, Figura 4). Los controles "sin sentido" son controles que incluyen ADN monocatenario que no es complementario a ARN diana en el gen que se expresa y, por consiguiente, no se espera que inhiba su expresión.

Además, la actividad antisentido también se muestra frente a la expresión del gen de VPH E7 (véase, Ejemplo 7). El VPH E7 es fundamental para la propagación del ciclo de vida vírico del VPH y es una diana para la intervención terapéutica (Jonson y col., 2008).

La disposición de dos cadenas de oligonucleótidos para proporciona una región o secuencia de unión de proteínas bicatenaria, mientras que deja regiones monocatenarias libres de secuencia que tienen actividad antisentido proporciona un procedimiento de conjugación conveniente que puede usarse para unir los dominios antisentido a agentes ya descritos en la técnica (tales como LFn-GAL4 y PA83). Esto facilita el suministro citosólico de los agentes antisentido que pueden medir la regulación negativa de genes que codifican dianas de fármaco potenciales, por ejemplo VPH E7.

Ahora se describen realizaciones específicas de la invención con más detalles haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 comprende las Figuras 1a a 1e que muestran cinco composiciones distintas de acuerdo con la invención, que ilustran distintas topologías para la creación de un sitio de unión de proteínas bicatenario a partir de un par de oligonucleótidos antisentido monocatenarios;

La Figura 2 compara la actividad inhibitoria de una composición de acuerdo con la invención con otras composiciones antisentido en un ensayo sin células.

La Figura 3, mediante el uso de difusión de neutrones a bajo ángulo (SANS), muestra que en la presencia de composiciones antisentido de la invención, LFn-GAL4 dimeriza para formar composiciones de mayor peso molecular.

Las Figuras 4 y 5 ilustran el modo en el que el sistema descrito puede regular negativamente la expresión de dos genes distintos: mediante la regulación negativa de la expresión de Sintaxina5 se muestra en la Figura 4 y de VPH (serotipo 18) Early (E)7 se muestra en la Figura 5;

La Figura 6 es la secuencia de nucleótidos de LFn-GAL4 (SEQ ID No: 1);

La Figura 7 es la secuencia de proteínas de LFn (dominio I de LF) (SEQ ID No: 2);

La Figura 8 es la secuencia de proteínas de GAL4 (aminoácidos 1-147) (SEQ ID No: 3);

La Figura 9 es la secuencia de ADN de V5-LFn-GAL4-6His (SEQ ID No: 4);

La Figura 10 es la secuencia de proteínas de V5-LFn-GAL4-6His (SEQ ID No: 5);

La Figura 11 es la secuencia de ADN de MRGS-6His-PA83 (SEQ ID No: 6); y

La Figura 12 es la secuencia de proteínas de MRGS-6His-PA83 (SEQ ID No: 7).

Ejemplo 1: Formación de proteína lanzadera

Se enriqueció LFn-GAL4 a partir de cultivos de *E. coli* con un rendimiento de aproximadamente 5 mg/l. La secuencia de ADN que codifica la proteína de LFn-GAL4 es SEQ ID No: 4 (Figura 9). Esta secuencia se encuentra dentro del plásmido pET151/D (Invitrogen), un casete de expresión de *E. coli*.

La secuencia de ADN para LFn (dominio 1 de LF) y GAL4 (aminoácidos 1-147) (conocida en la técnica - Gaur y col., 2002) se subclonó en el casete de expresión bacteriana pET151/D. La adición de un marcador de epítipo V5 en el extremo N y marcador de afinidad de histidina 6x en el extremo C permitió la rápida inmunodetección y purificación de afinidad, respectivamente, de la proteína de fusión del listado bacteriano.

Producción recombinante de proteínas: Se transformaron bacterias químicamente competentes (*E. coli* BL21*DE3 (Invitrogen)) con plásmido purificado (descrito anteriormente) y se cultivaron durante la noche (10 ml) en triptona de extracto de levadura 2x (2xYT) de cultivo bacteriano, que contenía medio de ampicilina (200 µg/ml) antes de su subcultivo en grandes volúmenes (1 l) de 2xYT que también contenía una concentración similar de ampicilina. A continuación, se incubaron cultivos bacterianos en un agitar orbital configurado a 180 rpm (a 37 °C) durante 3 horas. Posteriormente, se añadió isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) a una concentración final de 500 µM y se incubó durante 3 horas adicionales. Se prepararon sedimentos bacterianos mediante centrifugación (6000 xg durante 10 min a 4 °C) y se sometieron a lisis usando prensa francesa configurada a 1.500 PSI. Los lisados bacterianos se sometieron a centrifugación adicional (20000 xg durante 20 min). El sobrenadante resultante se pasó por una columna de cromatografía de afinidad de 6xHis (resina Co²⁺ Tallon® (Clontech)). Se eluyó LFn-GAL4 usando 150 mM de imidazol en fracciones de 1 ml. Las fracciones se analizaron para su pureza proteica y concentración, se agruparon y sometieron a diálisis en tampón fosfato salino. La preparación proteica final se evaluó mediante SDS-PAGE y se sometió a tinción Coomassie (para determinar la pureza proteica) y análisis de transferencia de Western (usando un anticuerpo específico a V5 y 6xHis).

Ejemplo 2: Producción de proteína formadora de poros

Se enriqueció PA83 a partir de cultivos de *E. coli* BL21*DE3 con un rendimiento de aproximadamente 5 mg/l. Se obtuvo un plásmido que contenía la secuencia de ADN conocida que codificaba PA83 como una donación del Profesor Les Baillie (Universidad de Cardiff). Contenía la secuencia codificadora de PA83 subclonada en el vector de expresión bacteriano pQE30 que proporcionada un marcador de afinidad de histidina 6x de extremo N (Baillie y col., 2010). Las bacterias químicamente competentes se transformaron con plásmido purificado y se cultivó durante la noche como anteriormente. Durante la fase de crecimiento, los cultivos bacterianos de 1 l se incubaron cultivos bacterianos en un agitar orbital configurado a 180 rpm (a 37 °C) durante 3 horas. Posteriormente, se añadió (IPTG) a una concentración final de 500 µM y se incubó durante 2 horas adicionales. Se prepararon sedimentos bacterianos mediante centrifugación (6000 xg 10 mi) y se sometieron a lisis usando prensa francesa como antes. Los lisados bacterianos se sometieron a centrifugación adicional (20000 xg durante 20 min). El sobrenadante resultante se pasó por una columna de cromatografía de afinidad de histidina 6x. Se eluyó PA usando 150 mM de imidazol en fracciones de 1 ml. Las fracciones de proteínas se analizaron para su pureza y concentración, se agruparon y se sometieron a diálisis en tampón de fosfato salino (PBS). La preparación proteica final se evaluó mediante SDS-PAGE y se sometió a tinción Coomassie (para determinar la pureza) y análisis de transferencia de Western (usando un anticuerpo específico a PA).

La secuencia de aminoácidos para PA83 se muestra en la SEQ ID No: 7 (Figura 12 -MRGS-6His-proteína PA83).

Ejemplo 3: Formación de oligonucleótido antisentido con región de unión de proteínas bicatenaria

Se emparejaron dos oligonucleótidos, que codificaba cada uno una cadena de una secuencia de reconocimiento de GAL4, para formar una secuencia de unión de proteínas bicatenaria (GAL4) con secuencias antisentido monocatenarias flanqueantes. Las composiciones de OAS descritas (SEQ ID Nos: 8 y 9: véase, Ejemplo 4) se usaron en este caso. La composición resultante se muestra en la Figura 1a. Se llevó a cabo la hibridación de oligonucleótidos antisentido mediante ciclado térmico repetido (10 veces), fusión (1 min a 94 °C) y re-emparejamiento (1 min a 55 °C) los dos oligonucleótidos parcialmente solapados, dejando la secuencia de oligonucleótidos antisentido monocatenaria libre para interactuar con ARNm de un modo específico a secuencia.

Las Figuras 1a - 1e muestran varios topologías posibles de la secuencia de unión de proteínas (DS) de ADN (o análogos de ADN) respecto a la(s) secuencia(s) de ácidos nucleicos antisentido usando la estrategia de conjugación de proteína::oligonucleótido que se desvela en el presente documento. La Figura 1a muestra dos secuencias SEQ ID Nos: 8 y 9 orientadas en sentidos opuestos y unidas juntas mediante secciones complementarias - bases 23 a 48 en SEQ ID No: 8 que se unen con las bases 48 a 23 de la SEQ ID No. 9 (SEQ ID No. 9 se muestra el extremo 3' a 5' en la Figura 1a). Los híbridos de OAS de nuestra invención pueden o no pueden incluir una secuencia de ADN adicional que flanquea la(s) secuencia(s) antisentido. Como se muestra en las Figuras 1a - 1e, la región bicatenaria (unión de proteínas) del híbrido de OAS puede formarse en una cantidad de distintos modos. Por ejemplo, la región bicatenaria puede posicionarse entre dos secuencias antisentido (que pueden ser idénticas o distintas), como en la Figura 1a. Como alternativa, la región bicatenaria puede posicionarse en un lado de un oligonucleótido antisentido único, como en las Figuras 1b-1e.

Ejemplo 4: Producción de secuencias de ADN útiles para inhibir la expresión de proteínas específicas

Secuencia de oligonucleótidos antisentido específica para Sintaxina5 con secuencia de unión GAL4 y flanqueante:

Oligonucleótido directo (SEQ ID No: 8)
5' AATTTGTTTGTGAGGCTAATGCATGCCGGCTGCTCTGATGCCGGCAT 3'

Oligonucleótido inverso (SEQ ID No: 9)
5' AATTTGTTTGTGAGGCTAATGCATGCCGGCATCAGAGCAGCCGGCAT 3'

Secuencia de oligonucleótidos antisentido específica para VPH (serotipo 18) Early (E) 7 de transcripciones de ARNm, con secuencia de unión de GAL4 y flanqueante:

Oligonucleótido directo (SEQ ID No: 10)
5' GGTGCTCTGCTGAGCTTTCTATGCATGCCGGCTGCTCTGATGCCGGCAT 3'

Oligonucleótido inverso (SEQ ID No: 11)
5' GGTGCTCTGCTGAGCTTTCTATGCATGCCGGCATCAGAGCAGCCGGCAT 3'

Secuencia de oligonucleótidos antisentido específica para transcripciones de ARNm de TurboGFP, con secuencia de unión de GAL4 y flanqueante:

Oligonucleótido directo (SEQ ID No: 12)
5' GGTGCTCTTCATCTTGTGGTATGCCGGCTGCTCTGATGCCGGCAT 3'

Oligonucleótido inverso (SEQ ID No: 13)
5' GGTGCTCTTCATCTTGTGGTATGCCGGCATCAGAGCAGCCGGCATGCAT 3'

Los anteriores oligonucleótidos (SEQ ID Nos: 8-13) se sintetizaron con modificación de fosforotioato para potenciar

el tiempo de vida del oligonucleótido antisentido.

Pares de cebadores directos e inversos (SEQ ID Nos 8 con 9; 10 con 11; 12 con 13) se hibridaron usando un ciclador de PCR usando las siguientes condiciones: Se calentó a 94 °C durante 1 min y se enfrió a 55 °C durante 1 min, 10 veces. Este proceso de emparejamiento produjo secuencias de ADN monocatenarias y bicatenarias híbridas de acuerdo con la invención.

Ejemplo 5: Formación de un complejo de oligonucleótido-lanzadera (LFn-GAL4)

Se produjeron híbridos de OAS emparejados (como en el Ejemplo 4). Estos híbridos de OAS se co-incubaron con LFn-GAL4 en tampón fosfato salino (PBS) durante 30 min a temperatura ambiente en la estequiometría adecuada (es decir, aproximadamente una proteína 3:1 con respecto a la relación molar de oligonucleótidos).

Un tal producto obtenido de este modo se investigó mediante difusión de neutrones a bajo ángulo (SANS). El perfil resultante se compara en la Figura 3 con el obtenido en ausencia de cualquier oligonucleótido antisentido. La Figura 3 muestra la dimerización de LFn-GAL4 según se midió mediante SANS en respuesta a la adición de la composición de oligonucleótidos antisentido que se muestra en la Figura 1a - difusión de neutrones a bajo ángulo mediante LFn-GAL4 y LFn-GAL4::DS-oligonucleótido antisentido en PBS (a aproximadamente 0,5 mg/ml de LFn-GAL4 en cada caso). Las unidades del eje x de la Figura 3 son $q//\text{angstrom}$ y del eje y son 1/cm. La línea gruesa superior en negro muestra los resultados en presencia del OAS, en comparación con la línea fina inferior en la que el OAS está ausente. El diferencial en el perfil de difusión entre 0,01 y 0,04 ($q/1/\text{Å}$) es atribuible a la dimerización de LFn-GAL4, provocado por la asociación con la secuencia de unión de proteínas bicatenaria que forma parte del oligonucleótido (Figura 1a). En este caso, se cargaron cubetas de 2 mm (Hellman Analytics, Essex, Reino Unido) con LFn-GAL4 y LFn-GAL4::oligonucleótido estequiometría de 3:1 respectivamente (relación molar).

La intensidad de tal radiación de difusión es un reflejo del tamaño y forma del difusor, así como la composición (es decir, LFn-GAL4). Se examinaron tanto las proteínas individuales como sus mezclas. Para los componentes individuales, no se observó, en general, difusión, lo que indicaba su tamaño relativamente pequeño. En la mezcla de LFn-GAL4 y el oligonucleótido hibridado, se observó difusión, confirmando que se producía un interacción para formar estructuras más grandes (es decir, complejos de LFn-GAL4::OAS).

Ejemplo 6: Regulación negativa de expresión de genes diana (Sintaxina5)

Uno de los complejos producidos en el Ejemplo 5 se empleó para dirigir la expresión del gen Sintaxina5 en células Hela. La proteína PA83 formadora de poros se usó para ayudar a medir la translocación de membrana de oligonucleótidos antisentido mediante una interacción con LFn-GAL4. La porción de OAS del complejo consistía en dos secuencias de OAS (como en el ejemplo 4) hibridadas (SEQ ID Nos: 8 y 9). Las células Hela producen Sintaxina5 cuando se cultivan en condiciones normales. Las células Hela se trataron de diversos modos en un intervalo de concentraciones de complejo de OAS: 0 (control), 1, 10, 50, 100 y 200 pMol por litro.

En la Figura 4: la barra rellena en negro representa las células Hela tratadas con PA83, LFn-GAL4 y una "no-Sintaxina5" (específica a GFP) OAS (formada de la SEQ ID No: 12 y 13 hibridada). La barra sin relleno representa las células Hela tratadas con PBS solo. Estos dos tratamientos muestran la especificidad de secuencia para la regulación negativa de Sintaxina5 (puesto que la secuencias de OAS anti-GFP aquí es inactiva frente a la Sintaxina5) y sirven como controles negativos. Las barras rellenas con sombreado horizontal representan células Hela electroporadas con OAS híbrido específico para Sintaxina5 (formado a partir de las SEQ ID Nos: 8 y 9). Las barras rellenas con sombreado vertical representan células Hela tratadas con PA83, LFn-GAL4 y OAS híbrido específico para Sintaxina5 (formadas a partir de las SEQ ID Nos: 8 y 9). Las barras rellenas con sombreado diagonal representan células Hela tratadas con OAS híbrido específico para Sintaxina5 (formadas a partir de las SEQ ID Nos: 8 y 9) mezcladas con Oligofectamina (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los niveles de expresión de Sintaxina5 en las células se midió después de 24 horas usando inmunotransferencia. Los resultados se muestran como % de expresión de control (células Hela tratadas con PBS solo) (eje y). Los datos muestran que las composiciones de acuerdo con la invención regulan negativamente la expresión de Sintaxina5 de un modo específico a gen. Esto se demuestra en un nivel de población mediante transferencia de Western e inmunodetección. El gráfico de la Figura 4 muestra los niveles de expresión de Sintaxina5 y muestra el efecto de la carga de híbridos de oligonucleótidos antisentido (3,2 $\mu\text{g/ml}$) (SEQ ID Nos: 8 y 9) sobre LFn-GAL4 (50 $\mu\text{g/ml}$) co-incubado con PA (50 $\mu\text{g/ml}$) sobre células Hela con respecto a la expresión de un gen guardián, Derlina1 (para controlar cualquier variación en el número celular). Los datos que se muestran derivan de 3 experimentos por separado y demuestran que la adición de las composiciones descritas puede mediar la destrucción de un oligonucleótido antisentido de gen específico que codifica una secuencia antisentido (es decir, Sintaxina5). Los datos representan tres repeticiones para cada experimento y las barras de error representan el error estándar de la mediana.

Ejemplo 7: Regulación negativa de expresión de genes diana (VPH18 E7)

Se llevó a cabo un experimento para examinar la eficacia de los oligonucleótidos antisentido de anti-VPH E7 frente a la expresión de Virus de Papiloma Humano (serotipo 18) Early 7 en células Hela tal como se describe en el Ejemplo

6 anterior, pero usando distintas secuencias de oligonucleótidos. En este caso, los híbridos de OAS específicos a Sintaxina5 (formados a partir de la SEQ ID No: 8 y la SEQ ID No: 9) del Ejemplo 6 se sustituyeron con híbrido de OAS específico a VOH-E7 que contenía también la región de unión de proteínas híbrida y una pequeña región flanqueante (formada a partir de la SEQ ID No: 10 y la SEQ ID No: 11). En este ejemplo, se usaron 200 pM de oligonucleótido, asociado con LFn-GAL4 y PA83, (esta es la barra negra en el gráfico de la Figura 5). El resultado se muestra en la Figura 5: el % de expresión génica se muestra en el eje y. El tratamiento de control, PBS, se tomó como el 100 %: esta es la barra blanca en el gráfico de la Figura 5. Los datos representan tres repeticiones de cada experimento y las barras de error representan el error estándar de la mediana. Hubo una diferencia estadística entre los dos tratamientos ($p=0,0104$ tal como se midió mediante un ensayo t de una cola, no emparejado).

10 **Ejemplo 8: Toxicidad *in vitro* de composiciones de la invención con comparación con poli(etilenoimina)**

Los complejos de híbrido-lanzadera de OAS producidos como en el Ejemplo 5 se sometieron a ensayo para su toxicidad con respecto a poli(etilenoimina) (PEI) (Tabla 1). Estos datos muestran un diferencial en toxicidad con respecto a células expuestas a concentraciones variantes de tanto PEI, un polímero catiónico bien caracterizado en la literatura como que es capaz de mediar la transfección, como proteína de LFn-GAL4 después de la hibridación con híbridos de OAS en presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ de PA durante 72 h. Se normalizó la viabilidad celular con respecto a células no tratadas y se midió mediante la adición de MTT (Richardson *et al.*, 1999).

Tabla 1

	Cl ₅₀ en HeLa (microgramos/ml)	Cl ₅₀ en Vero (microgramos/ml)
25 KDa PEI ramificado	2,9 +/- 0,6	7,3 +/- 0,1
0,8 KDa PEI ramificado	2,4 +/- 0,2	7,4 +/- 0,3
20 KDa PEI lineal	3,0 +/- 0,1	6,9 +/- 0,5
PA83	> 100	> 100
OAS	> 100	> 100
GAL4-LFn	> 100	> 100
OAS ::GAL4-LFn+PA83	> 100	> 100

Ejemplo 9: Inhibición antisentido de ensayo de translación *in vitro* usando distintas composiciones de oligonucleótidos antisentido

20 La Figura 2 muestra el efecto de las composiciones de la invención en comparación con OAS de componente en un ensayo sin células (en el que la translocación de membrana no es limitante a la tasa).

Se llevaron a cabo reacciones de control usando "un kit de translación *in vitro* mini de alto rendimiento de una etapa" (Thermo Scientific), junto con un plásmido de control que codifica la proteína turboGFP (proteína fluorescente verde - Evrogen). Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 4,5 μl (incubadas durante 3 h a 30 °C) y la expresión de turboGFP se controló mediante inmunotransferencia de Western usando un anticuerpo primario anti-6His (dilución 1:1000) y un anticuerpo secundario conjugado de HRP anti-ratón (1:1000). Se llevó a cabo la detección usando un kit ECL Picostable (GE Healthcare). Se añadieron tres composiciones de oligonucleótidos antisentido (OAS) de GFP anti-turbo a la reacción en concentraciones distintas al inicio del período de incubación de 3 h previamente descrito.

30 Los resultados se muestran en la Figura 2, ($n=3 \pm \text{SEM}$) respecto a un control que no contiene oligonucleótidos antisentido. En la Figura 2 el eje y representa la expresión de turboGFP (%) con respecto a un control sin tratar, mientras que el eje x representa la concentración de oligonucleótido antisentido añadido a la reacción (en pMol). Los puntos de datos representados con un recuadro se derivaron de un oligonucleótido de OAS monocatenario, SEQ ID No: 12, que consistía en la secuencia antisentido de turboGFP y (una cadena de la) secuencia de unión de proteínas. Los puntos de datos representados mediante triángulos representan datos generados a partir de solo la secuencia antisentido incorporada en la SEQ ID No: 12 es decir los 21 meros de GGTGCTCTTCATCTTGTTGGA, SEQ ID No: 21). Los puntos de datos representados mediante círculos se generaron a partir del híbrido de OAS de la invención formado mediante emparejamiento juntas las SEQ ID Nos: 12 y 13. Los resultados que se muestran en la Figura 2 ilustran que (*in vitro*) la presencia de la secuencia de unión de proteínas en el híbrido de OAS no inhibe la actividad de la secuencia antisentido anterior una concentración de OAS de 30 pMol.

Nuestra invención se puede usar para producir composiciones antisentido que tienen sustancialmente actividad antisentido no significativamente reducida (tal como se midió en el ensayo sin células), con respecto a un control antisentido que no tenía secuencia de unión de proteínas o secuencia flanqueante, en o por encima de una concentración de 30 pMol de oligonucleótido antisentido (OAS). El Ejemplo 9 anterior (Figura 2) ilustra esto.

45 **Referencias:**

Baillie L.W. (2009) Is new always better than old?: The development of human vaccines for anthrax. Hum Vaccine, 5(12):806-16.

- Baillie L.W., Huwar T.B., Moore S., Mellado-Sanchez G., Rodriguez L., Neeson B.N., Flick-Smith H.C., Jenner D.C., Atkins H.S., Ingram R.J., Altmann D.M., Nataro J.P., y Pasetti M.F. (2010) An anthrax subunit vaccine candidate based on protective regions of *Bacillus anthracis* protective antigen and lethal factor. *Vaccine*, 28(41), pág.6740-6748.
- 5 Birocchio A., Leonetti C., y Zupi G. (2003) The future of antisense therapy: combination of anticancer treatments. *Oncogene*, 22:6579-6588.
- Campbell R. N., Leverenz M. K., Ryan L. A., Reece R. J. (2008). Metabolic control of transcription: Paradigms and lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* 414(2): 177-87.
- 10 Cieslak J., Ausín C., Chmielewski M.K., Kauffman J.S., Snyder J., Del-Grosso A., Beaucage S.L. (2005) NMR study of the desulfurization of oligonucleoside phosphorothioates effected by "aged" trichloroacetic acid solutions. *J. Org. Chem.* 70(8):3303-6.
- Gaur R., Gupta P.K., Goyal A., Wiles W., y Singh Y. (2002) Delivery of nucleic acid into mammalian cells by anthrax toxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 297:1121-1127.
- 15 Jonson A. L., Rogers L. M., Ramakrishnan S. and Downs Jr L. S. (2008), Gene silencing with siRNA targeting E6/E7 as a therapeutic intervention in a mouse model of cervical cancer. *Gynecologic Oncology.* 111(2): 356-364.
- Kim S.H., Mok H., Jeong J.H., Kim S.W., Park T.G. (2006) Comparative evaluation of target-specific GFP gene silencing efficiencies for antisense ODN, synthetic siRNA, and siRNA plasmid complexed with PEI-PEG-FOL conjugate. *Bioconjug Chem.* 17(1):241-4.
- 20 Krantz B.A., Melnyk R.A., Zhang S., Juris S.J., Lacy D.B., Wu Z., Finkelstein A., Collier R.J.. (2005) A phenylalanine clamp catalyzes protein translocation through the anthrax toxin pore *Science.* 309(5735):777-81.
- Kushner N., Zhang D., Touzjian N., Essex M., Lieberman J., y Lu Y. (2003) A Fragment of Anthrax Lethal Factor Delivers Proteins to the Cytosol without Requiring Protective Antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (11): 6652-6657.
- 25 Leumann C., DNA analogues: from supramolecular principles to biological properties. (2002) *Bioorg. Med Chem.*; 10(4):841-54.
- Lysik M.A., Wu-Pong S. (2003) Innovations in oligonucleotide drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 92:1559-1573.
- Parkin, DM. (2006) The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer.* 118:3030-3044.
- 30 Richardson S., Ferruti P. and Duncan R. (1999) Poly(amidoamine)s as potential endosomolytic polymers: Evaluation *in vitro* and body distribution in normal and tumour bearing animals. *J. Drug Targeting*, 6(6), 391-404.
- Roehr B, (1998) Fomivirsen approved for CMV retinitis. *J. Int. Physicians AIDS Care.* 4(10): 14-6.
- Sandvig K., and van Deurs B. (2005). Delivery into cells: Lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Therapy.* (12)s 865-872,
- 35 Sandvig, Kirsten; Torgersen, Maria Lyngaas; Engedal, Kim Nikolai; Skotland, Tore & Iversen, Tore Geir (2010). Protein toxins from plants and bacteria: Probes for intracellular transport and tools in medicine. *FEBS Letters.* 584(12)s 2626-2634.
- Suga K. Hattori H. and Saito A. (2005). RNA interference-mediated silencing of the syntaxin 5 gene induces Golgi fragmentation but capable of transporting vesicles. *FEBS Letters.* 579(20):4226-4234.
- 40 Patente de los EE.UU. WO97/23236: The use of toxin peptides and / or affinity handles for delivering compounds into cells.
- Yacyshyn B.R., Bowen-Yacyshyn M.B., Jewell L., Rothlein R.A., Mainolfi E., Tami J.A., Bennett C.F., Kisner D.L., and Shanahan W.R. (1998) A placebo-controlled trial of ICAM-1 antisense oligonucleotide in the treatment of steroid-dependent Crohn's disease. *Gastroenterology.* 114:1133-1142.
- 45 Zornetta I., Brandi L., Janowiak B., Dal Molin F., Tonello F., Collier J. and Montecucco C. (2010) Imaging the cell entry of the anthrax oedema and lethal toxins with fluorescent protein chimeras, *Cellular Microbiology*, 12(10); 1435-45.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Greenwich University

ES 2 714 531 T3

<120> Composiciones de oligonucleótidos antisentido
 <130> 120120WO
 <150> UK1131057.2
 <151> 21/06/2013
 5 <160> 21
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 1131
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Derivada de más de una fuente
 <400> 1
 15 atggaacgca acaaaactca ggaggaacac ctgaaagaga tcatgaaaca cattgttaaa 60
 atcgaggatga aaggcgaaga agcggftaaa aaggaggctg ccgaaaagct gctggagaag 120
 gtaccgctg atgtgctgga aatgtataaa gcgattggg gcaaaatcta catcgtggat 180
 ggtgatatta ccaaacacat ctccctggaa gcactgagcg aagacaagaa gaagatcaaa 240
 gatattctacg gcaaggacgc gctgctgcac gagcattacg ttacgcaaa agaaggttac 300
 20 gaaccggtgc tggttatcca gtccagcgag gattacgtcg aaaatacggaa aaaagctctg 360
 aacgtatatt acgaaattgg taaatcctg tctcgtgaca ttctgagcaa aattaaccaa 420
 ccttatcaga agttcttggaa cgttctgaac accatcaaaa acgcttctga ctccgacggc 480
 caggacctgc tgttactaa tcagctgaaa gaacatccga ccgatttctc tgtagaattc 540
 ctggaacaga actctaacga ggtccaagaa gttttgcca aagcattcgc gtactacatc 600
 25 gagccgcagc atcgcgagct gctgcagctg tacgctccag aagcctcaa ctatatggac 660
 aaattcaatg aacaagaaat caacctgtct atgaaactgc tgcctccat cgaacaggct 720
 tgcgatattc gtcgtctgaa gaaactgaaa tgctctaaag aaaaaccgaa atgcgagaaa 780
 tgcctgaaaa acaactggga atgtcgtctat tcccctaaaa ccaaaccgtt cccactgacc 840
 cgtgagcacc tgaccgaagt agaatcccgt ctggaacgctc tggagcagct gtttctgctg 900
 30 atttcccgc gtgaagacct ggacatgac ctgaaaatgg atagcctgca ggatatcaaa 960
 gcactgctga ccggtctgtt tgtgcaggac aacgtcaaca aagacgctgt tactgatcgc 1020
 ctggcgagcg ttgaaactga tatgccgctg accctgcgctc agcaccgtat 1080
 agctccagcg aagaatctag caacaaaggc cagcgcagc tgaccgtag c 1131
 <210> 2
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Bacillus anthracis
 <400> 2
 35

ES 2 714 531 T3

Met Glu Arg Asn Lys Thr Gln Glu Glu His Leu Lys Glu Ile Met Lys
 1 5 10 15

His Ile Val Lys Ile Glu Val Lys Gly Glu Glu Ala Val Lys Lys Glu
 20 25 30

Ala Ala Glu Lys Leu Leu Glu Lys Val Pro Ser Asp Val Leu Glu Met
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ile Gly Gly Lys Ile Tyr Ile Val Asp Gly Asp Ile Thr
 50 55 60

Lys His Ile Ser Leu Glu Ala Leu Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ile Lys
 65 70 75 80

Asp Ile Tyr Gly Lys Asp Ala Leu Leu His Glu His Tyr Val Tyr Ala
 85 90 95

Lys Glu Gly Tyr Glu Pro Val Leu Val Ile Gln Ser Ser Glu Asp Tyr
 100 105 110

Val Glu Asn Thr Glu Lys Ala Leu Asn Val Tyr Tyr Glu Ile Gly Lys
 115 120 125

Ile Leu Ser Arg Asp Ile Leu Ser Lys Ile Asn Gln Pro Tyr Gln Lys
 130 135 140

Phe Leu Asp Val Leu Asn Thr Ile Lys Asn Ala Ser Asp Ser Asp Gly
 145 150 155 160

Gln Asp Leu Leu Phe Thr Asn Gln Leu Lys Glu His Pro Thr Asp Phe
 165 170 175

Ser Val Glu Phe Leu Glu Gln Asn Ser Asn Glu Val Gln Glu Val Phe
 180 185 190

Ala Lys Ala Phe Ala Tyr Tyr Ile Glu Pro Gln His Arg Asp Val Leu
 195 200 205

Gln Leu Tyr Ala Pro Glu Ala Phe Asn Tyr Met Asp Lys Phe Asn Glu
 210 215 220

Gln Glu Ile Asn Leu Ser
 225 230

- 5
- <210> 3
 - <211> 147
 - <212> PRT
 - <213> Saccharomyces cerevisiae
 - <400> 3

ES 2 714 531 T3

Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu
 1 5 10 15

Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu
 20 25 30

Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro
 35 40 45

Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu
 50 55 60

Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile
 65 70 75 80

Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu
 85 90 95

Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala
 100 105 110

Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser
 115 120 125

Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu
 130 135 140

Thr Val Ser
 145

<210> 4
 <211> 1197
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Derivada de más de una fuente

<400> 4

atgggtaaac cgattccgaa cccgctgctg ggcttgact ctactatgga acgcaacaaa 60
 actcaggagg aacacctgaa agagatcatg aaacacattg ttaaaatcga ggtgaaaggc 120

ES 2 714 531 T3

gaagaagcgg ttaaaaagga ggctgccgaa aagctgctgg agaaggtacc gtctgatgtg 180
ctggaaatgt ataaagcgat tgggtggcaaa atctacatcg tggatggtga tattaccaaa 240
cacatctccc tggaagcact gagcgaagac aagaagaaga tcaaagatat ctacggcaag 300
gacgcgctgc tgcacgagca ttacgtttac gcaaaagaag gttacgaacc ggtgctggtt 360
atccagtcca gcgaggatta cgtcgaaaat acggaaaaag ctctgaacgt atattacgaa 420
attggtaaaa tcctgtctcg tgacattctg agcaaaatta accaacctta tcagaagttc 480
ctggacgttc tgaacaccat caaaaacgct tctgactccg acggccagga cctgctgttc 540
actaatcagc tgaaagaaca tccgaccgat ttctctgtag aattcctgga acagaactct 600
aacgaggtcc aagaagtttt tgccaaagca ttcgctact acatcgagcc gcagcatcgc 660
gacgtgctgc agctgtacgc tccagaagcc ttcaactata tggacaaatt caatgaacaa 720
gaaatcaacc tgtctatgaa actgctgtcc tccatcgaac aggcttgca tatctgtcgt 780
ctgaagaaac tgaaatgctc taaagaaaaa ccgaaatgcg cgaaatgcct gaaaaacaac 840
tggaatgtc gctattcccc taaaaccaa cgttctccac tgaccctgac gcacctgacc 900
gaagtagaat cccgtctgga acgtctggag cagctgtttc tgctgatttt cccgcgtgaa 960
gacctggaca tgatcctgaa aatggatagc ctgcaggata tcaaagcact gctgaccggt 1020
ctgtttgtgc aggacaacgt caacaaagac gctgttactg atcgcctggc gagcgttgaa 1080
actgatatgc cgctgaccct gcgtcagcac cgtatctccg caacgagctc cagcgaagaa 1140
tctagcaaca aaggtcagcg ccagctgacc gttagccacc accatcacca ccaactaa 1197

<210> 5

<211> 398

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivada de más de una fuente

<400> 5

Met Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Met
1 5 10 15
Glu Arg Asn Lys Thr Gln Glu Glu His Leu Lys Glu Ile Met Lys His
20 25 30
Ile Val Lys Ile Glu Val Lys Gly Glu Glu Ala Val Lys Lys Glu Ala
35 40 45
Ala Glu Lys Leu Leu Glu Lys Val Pro Ser Asp Val Leu Glu Met Tyr
50 55 60

ES 2 714 531 T3

Lys Ala Ile Gly Gly Lys Ile Tyr Ile Val Asp Gly Asp Ile Thr Lys
 65 70 75 80

His Ile Ser Leu Glu Ala Leu Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ile Lys Asp
 85 90 95

Ile Tyr Gly Lys Asp Ala Leu Leu His Glu His Tyr Val Tyr Ala Lys
 100 105 110

Glu Gly Tyr Glu Pro Val Leu Val Ile Gln Ser Ser Glu Asp Tyr Val
 115 120 125

Glu Asn Thr Glu Lys Ala Leu Asn Val Tyr Tyr Glu Ile Gly Lys Ile
 130 135 140

Leu Ser Arg Asp Ile Leu Ser Lys Ile Asn Gln Pro Tyr Gln Lys Phe
 145 150 155 160

Leu Asp Val Leu Asn Thr Ile Lys Asn Ala Ser Asp Ser Asp Gly Gln
 165 170 175

Asp Leu Leu Phe Thr Asn Gln Leu Lys Glu His Pro Thr Asp Phe Ser
 180 185 190

Val Glu Phe Leu Glu Gln Asn Ser Asn Glu Val Gln Glu Val Phe Ala
 195 200 205

Lys Ala Phe Ala Tyr Tyr Ile Glu Pro Gln His Arg Asp Val Leu Gln
 210 215 220

Leu Tyr Ala Pro Glu Ala Phe Asn Tyr Met Asp Lys Phe Asn Glu Gln
 225 230 235 240

Glu Ile Asn Leu Ser Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys
 245 250 255

Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys
 260 265 270

Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys
 275 280 285

Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser
 290 295 300

Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu
 305 310 315 320

ES 2 714 531 T3

Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala
 325 330 335

Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val
 340 345 350

Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg
 355 360 365

Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys
 370 375 380

Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser His His His His His His
 385 390 395

<210> 6
 <211> 2244
 <212> ADN
 <213> Bacillus anthracis
 <400> 6

5

```

atgagaggat cgcatcacca tcaccatcac ggatccgaag ttaaacagga gaaccggtta      60
ttaaataaat cagaatcaag ttcccagggg ttactaggat actatatttag tgatttgaat      120
tttcaagcac ccatggtggt tacctcttct actacagggg atttatctat tcctagttct      180
gagttagaaa atattccatc ggaaaaccaa tattttcaat ctgctatttg gtcaggattt      240
atcaaagtta agaagagtga tgaatataca tttgctactt ccgctgataa tcatgtaaca      300
atgtgggtag atgaccaaga agtgattaat aaagcttcta attctaaca aatcagatta      360
gaaaaaggaa gattatatca aataaaaatt caatatcaac gagaaaatcc tactgaaaaa      420
ggattggatt tcaagttgta ctggaccgat tctcaaaata aaaaagaagt gatttctagt      480
gataacttac aattgccaga attaaaacaa aaatcttcga actcaagaaa aaagcgaagt      540
acaagtgctg gacctacggt tccagaccgt gacaatgatg gaatccctga ttcattagag      600
gtagaaggat atacggttga tgtcaaaaat aaaagaactt ttctttcacc atggatttct      660
aatattcatg aaaagaaagg attaaccaaa tataaatcat ctctgaaaa atggagcacg      720
gcttctgatc cgtacagtga tttcgaaaag gttacaggac ggattgataa gaatgtatca      780
ccagaggcaa gacaccccct tgtggcagct tatccgattg tacatgtaga tatggagaat      840
attattctct caaaaaatga ggatcaatcc acacagaata ctgatagtca aacgagaaca      900
ataagtaaaa atacttctac aagtaggaca cactactagt aagtacatgg aatgcagaa      960
gtgcatgcgt cgttctttga tattggtggg agtgtatctg caggatttag taattcgaat     1020
tcaagtacgg tcgcaattga tcattcacta tctctagcag gggaaagaac ttgggctgaa     1080
    
```

ES 2 714 531 T3

acaatggggtt taaataccgc tgatacagca agattaaatg ccaatattag atatgtaaat 1140
actgggacgg ctccaatcta caacgtgtta ccaacgactt cgttagtgtt aggaaaaaat 1200
caaacactcg cgacaattaa agctaaggaa aaccaattaa gtcaaatact tgcacctaata 1260
aattattatc cttctaaaaa cttggcgcca atcgcattaa atgcacaaga cgatttcagt 1320
tctactccaa ttacaatgaa ttacaatcaa tttcttgagt tagaaaaaac gaacaatta 1380
agattagata cggatcaagt atatgggaat atagcaacat acaattttga aaatggaaga 1440
gtgagggtgg atacaggctc gaactggagt gaagtgttac cgcaaattca agaaacaact 1500
gcacgtatca tttttaatgg aaaagattta aatctggtag aaaggcggat agcggcggtt 1560
aatcctagtg atccattaga aacgactaaa ccggatatga cattaanaaga agcccttaaa 1620
atagcatttg gatttaacga accgaatgga aacttacaat atcaaggga agacataacc 1680
gaatctgatt ttaatttcga tcaacaaaca tctcaaaaata tcaagaatca gttagcggaa 1740
ttaaacgcaa ctaacatata tactgtatta gataaaatca aattaatgc aaaaatgaat 1800
atcttaataa gagataaacg ttttcattat gatagaaata acatagcagt tggggcggat 1860
gagtcagtag ttaaggaggc tcatagagaa gtaattaatt cgtcaacaga gggattattg 1920
ttaaatattg ataaggatat aagaaaaata ttatcagggtt atattgtaga aattgaagat 1980
actgaagggc ttaaagaagt tataaatgac agatatgata tgttgaatat ttctagttta 2040
cggcaagatg gaaaaacatt tatagatctt aaaaaatata atgataaatt accgttatat 2100
ataagtaatc ccaattataa ggtaaatgta tatgctgtta ctaaagaaaa cactattatt 2160
aatcctagtg agaatgggga tactagtacc aacgggatca agaaaatctt aatcttttct 2220
aaaaaaggct atgagatagg atga 2244

<210> 7
<211> 747
<212> PRT
5 <213> Bacillus anthracis
<400> 7

Met	Arg	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	Gly	Ser	Glu	Val	Lys	Gln
1				5					10					15	
Glu	Asn	Arg	Leu	Leu	Asn	Glu	Ser	Glu	Ser	Ser	Ser	Gln	Gly	Leu	Leu
			20					25					30		
Gly	Tyr	Tyr	Phe	Ser	Asp	Leu	Asn	Phe	Gln	Ala	Pro	Met	Val	Val	Thr
		35					40					45			
Ser	Ser	Thr	Thr	Gly	Asp	Leu	Ser	Ile	Pro	Ser	Ser	Glu	Leu	Glu	Asn
	50					55					60				

ES 2 714 531 T3

Ile Pro Ser Glu Asn Gln Tyr Phe Gln Ser Ala Ile Trp Ser Gly Phe
65 70 75 80

Ile Lys Val Lys Lys Ser Asp Glu Tyr Thr Phe Ala Thr Ser Ala Asp
85 90 95

Asn His Val Thr Met Trp Val Asp Asp Gln Glu Val Ile Asn Lys Ala
100 105 110

Ser Asn Ser Asn Lys Ile Arg Leu Glu Lys Gly Arg Leu Tyr Gln Ile
115 120 125

Lys Ile Gln Tyr Gln Arg Glu Asn Pro Thr Glu Lys Gly Leu Asp Phe
130 135 140

Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Ser Gln Asn Lys Lys Glu Val Ile Ser Ser
145 150 155 160

Asp Asn Leu Gln Leu Pro Glu Leu Lys Gln Lys Ser Ser Asn Ser Arg
165 170 175

Lys Lys Arg Ser Thr Ser Ala Gly Pro Thr Val Pro Asp Arg Asp Asn
180 185 190

Asp Gly Ile Pro Asp Ser Leu Glu Val Glu Gly Tyr Thr Val Asp Val
195 200 205

Lys Asn Lys Arg Thr Phe Leu Ser Pro Trp Ile Ser Asn Ile His Glu
210 215 220

Lys Lys Gly Leu Thr Lys Tyr Lys Ser Ser Pro Glu Lys Trp Ser Thr
225 230 235 240

Ala Ser Asp Pro Tyr Ser Asp Phe Glu Lys Val Thr Gly Arg Ile Asp
245 250 255

Lys Asn Val Ser Pro Glu Ala Arg His Pro Leu Val Ala Ala Tyr Pro
260 265 270

Ile Val His Val Asp Met Glu Asn Ile Ile Leu Ser Lys Asn Glu Asp
275 280 285

Gln Ser Thr Gln Asn Thr Asp Ser Gln Thr Arg Thr Ile Ser Lys Asn
290 295 300

Thr Ser Thr Ser Arg Thr His Thr Ser Glu Val His Gly Asn Ala Glu

ES 2 714 531 T3

Glu Phe Asp Phe Asn Phe Asp Gln Gln Thr Ser Gln Asn Ile Lys Asn
565 570 575

Gln Leu Ala Glu Leu Asn Ala Thr Asn Ile Tyr Thr Val Leu Asp Lys
580 585 590

Ile Lys Leu Asn Ala Lys Met Asn Ile Leu Ile Arg Asp Lys Arg Phe
595 600 605

His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser Val Val
610 615 620

Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu Leu
625 630 635 640

Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile Val
645 650 655

Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg Tyr
660 665 670

Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe Ile
675 680 685

Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn Pro
690 695 700

Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile Ile
705 710 715 720

Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys Ile
725 730 735

Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly
740 745

<210> 8

<211> 48

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 8

aatgtgttg ttgaggctaa tgcattgccg ctgctctgat gccggcat 48

10

<210> 9

<211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Sintética

ES 2 714 531 T3

<400> 9
 aattgtttg ttgaggctaa tgcgatgccg catcagagca gccggcat 48

 <210> 10
 <211> 49
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Derivada de más de una fuente

 <400> 10
 10 ggtcgtctgc tgagctttct atgcgatgccg gctgctctga tgccggcat 49

 <210> 11
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Derivada de más de una fuente

 <400> 11
 ggtcgtctgc tgagctttct atgcgatgccg gcatcagagc agccggcat 49

 <210> 12
 20 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Derivada de más de una fuente

 25 <400> 12
 ggtgctcttc atctgttgg tatgcgatgcc ggctgctctg atgccggcat 50

 <210> 13
 <211> 50
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Derivada de más de una fuente

 <400> 13
 ggtgctcttc atctgttgg tatgccggca tcagagcagc cggcatgcat 50

 <210> 14
 <211> 25
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Derivada de más de una fuente

 40 <400> 14
 atgccggcat cagagcagcc ggcatt 25

 <210> 15
 <211> 25
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Derivada de más de una fuente

 <400> 15
 50 atgccggctg ctctgatgcc ggcatt 25

<210> 16
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Derivada de más de una fuente
 <400> 16
 tacggccgac gagactacgg ccgtagcgtaa attgtttgt tgaggcta 48
 10 <210> 17
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Derivada de más de una fuente
 15 <400> 17
 atgccggcat cagagcagcc ggcagcgtaa attgtttgt tgaggcta 48
 20 <210> 18
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Derivada de más de una fuente
 <400> 18
 aattgtttg ttgaggcta 19
 25 <210> 19
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Derivada de más de una fuente
 <400> 19
 cggctgctct gatgccg 17
 35 <210> 20
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Derivada de más de una fuente
 <400> 20
 40 cggcatcaga gcagccg 17
 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Derivada de más de una fuente
 <400> 21
 ggtgctctc atctgttg a 21

REIVINDICACIONES

1. Una composición de oligonucleótidos antisentido útil para el suministro de oligonucleótido antisentido en el citosol de una célula, que comprende:
 - 5 un par de oligonucleótidos parcialmente complementarios monocatenarios, en la que los dos oligonucleótidos se hibridan para proporcionar al menos una secuencia antisentido monocatenaria y al menos una secuencia de unión a proteínas bicatenaria;
 - una proteína lanzadera capaz de transportar material genético a través de un poro de una membrana celular, comprendiendo la proteína lanzadera un dominio de unión de ácidos nucleicos que reconoce la secuencia de unión de proteínas bicatenaria y se une no covalentemente a ella, en la que la proteína lanzadera contiene
 - 10 dominio I (LFn) de factor letal (LF) de *B. anthracis*; y
 - una proteína formadora de poros que es Antígeno Protector PA83 de factor de virulencia de *B. anthracis*
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un oligonucleótido que está modificado mediante sulfonación para aumentar su estabilidad.
3. Una composición de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en la que la secuencia de unión de proteínas es CGG-N11-CCG, en la que "N" es cualquier base de purina o pirimidina.
- 15 4. Una composición de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en la que la secuencia de unión de proteínas es:

5'-CGGCTGCTCTGATGCCG-3' o 5'-CGGCATCAGAGCAGCCG-3'.
5. Una composición de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en la que al menos uno de los dominios (II-IV) del factor letal (LF) de *B. anthracis* se reemplaza por el dominio de unión de ácidos nucleicos.
- 20 6. Una composición de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el dominio de unión de ácidos nucleicos de la proteína lanzadera es GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae*.
7. Una composición de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la secuencia antisentido es ADN monocatenario designado para hibridarse a ARN mensajero que deriva de un gen diana.
- 25 8. Una composición de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el gen diana se expresa mediante un virus.
9. Una composición de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en la que el gen diana se expresa mediante Virus de Papiloma Humano (VPH).
- 30 10. Un procedimiento *in vitro* de regulación negativa de la expresión de un gen diana en el citosol de una célula que comprende el suministro de una composición de oligonucleótidos antisentido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y a través de la membrana de la célula.
11. Una composición de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en el tratamiento médico y, opcionalmente, que contiene adicionalmente al menos un aditivo seleccionado entre el grupo que consiste en excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 35 12. Una composición de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento de un sujeto infectado con Virus del Papiloma Humano (VPH).
13. Una composición de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la reivindicación 11, para su uso en el
- 40 tratamiento de cáncer, por ejemplo, cáncer cervical u oral.
14. Un procedimiento de conjugación de manera no covalente de un oligonucleótido antisentido a una proteína lanzadera, comprendiendo el procedimiento:
 - (i) proporcionar dos oligonucleótidos parcialmente complementarios monocatenarios;
 - 45 (ii) hibridar los dos oligonucleótidos para formar un híbrido de oligonucleótido, en el que el híbrido comprende al menos una secuencia antisentido monocatenaria y al menos una secuencia de unión a proteínas bicatenaria;
 - (iii) proporciona una proteína lanzadera capaz de transportar material genético a través de un poro de una membrana celular y que tiene un dominio de unión de ácidos nucleicos que reconoce la secuencia de unión de proteínas bicatenaria y que proporciona una proteína formadora de poros, en el que la proteína lanzadera contiene dominio I (LFn) de factor letal (LF) de *B. anthracis* y la proteína formadora de poros es Antígeno Protector PA83 de factor de virulencia de *B. anthracis*; y
 - 50 (iv) conjugar de manera no covalente la proteína lanzadera al híbrido antisentido por medio del dominio de unión de ácidos nucleicos de la proteína y la secuencia de unión de proteínas del híbrido de oligonucleótido.

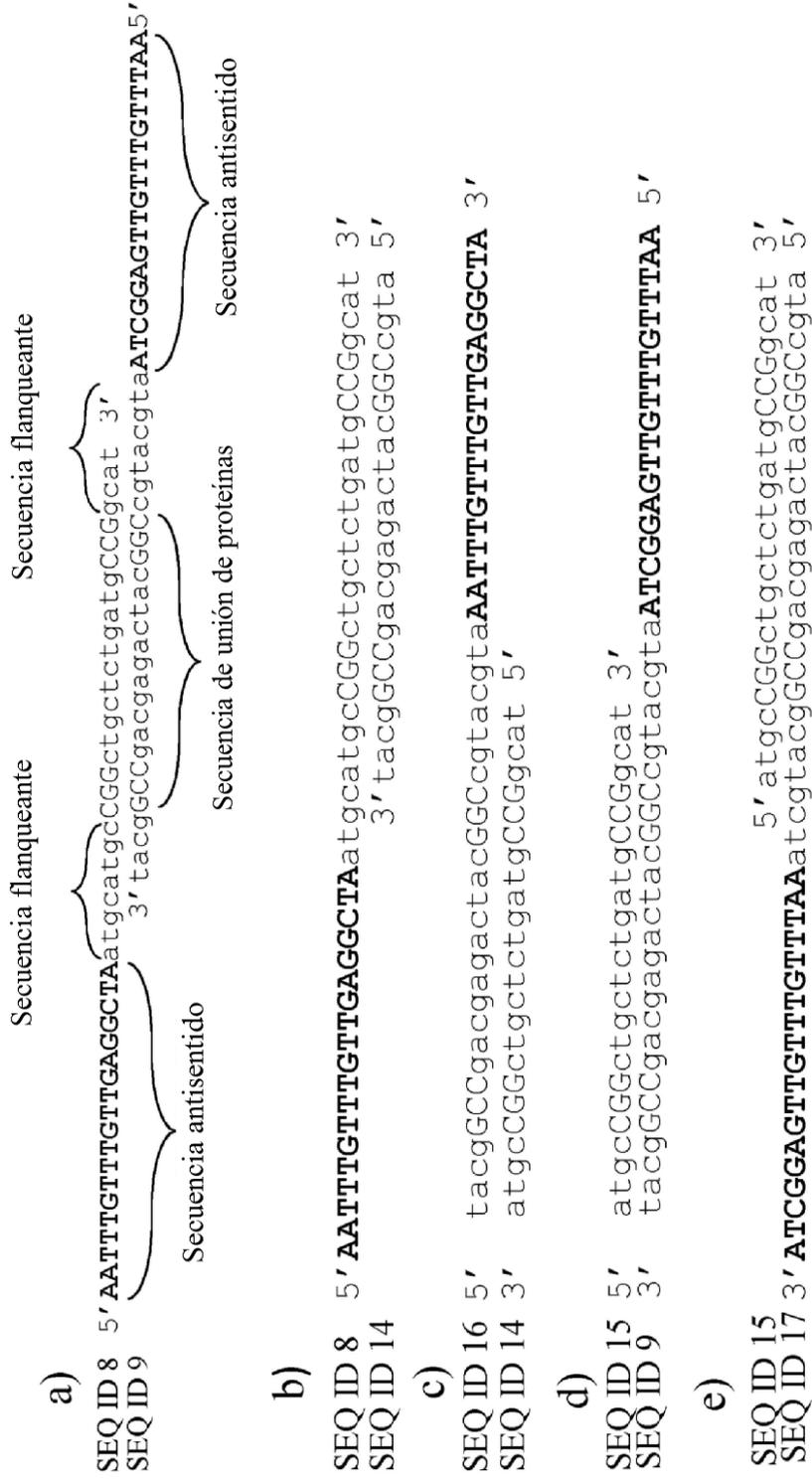
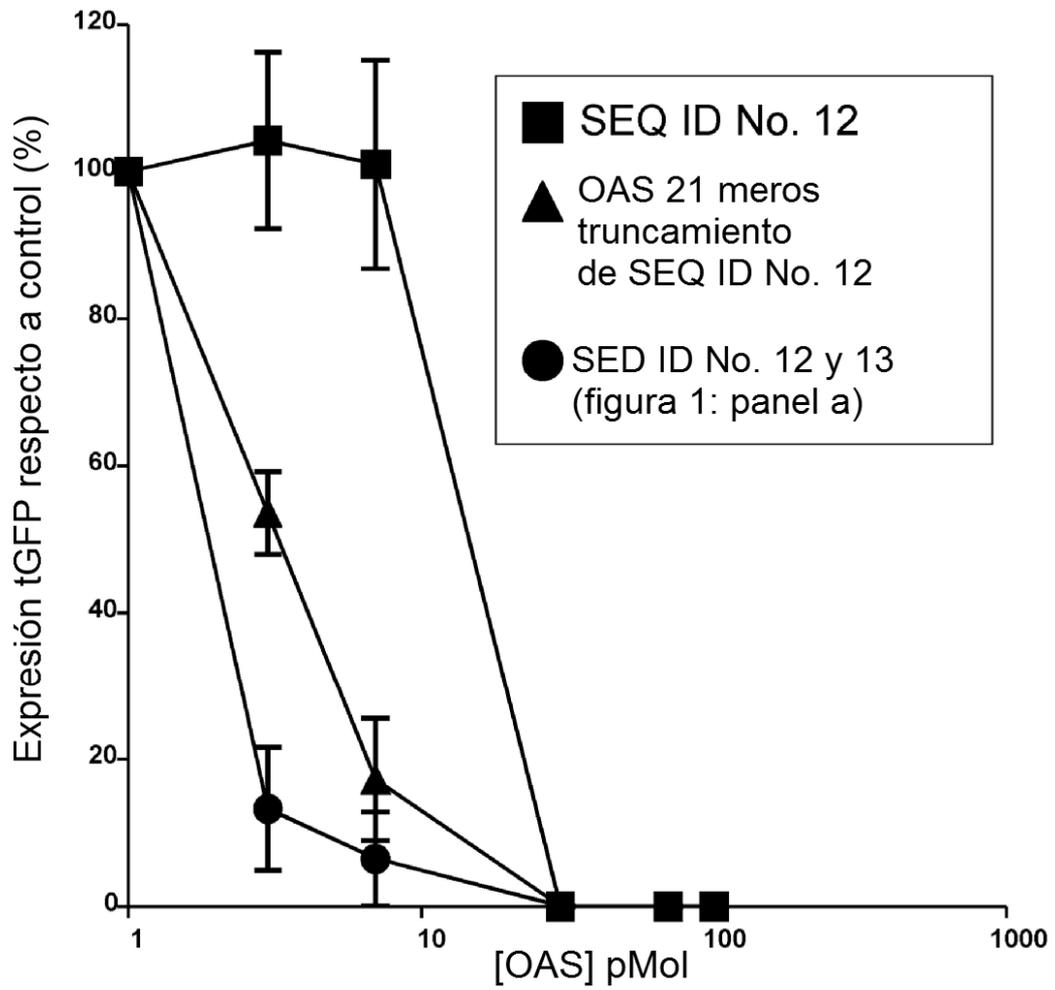


Figura 1

**Figura 2**

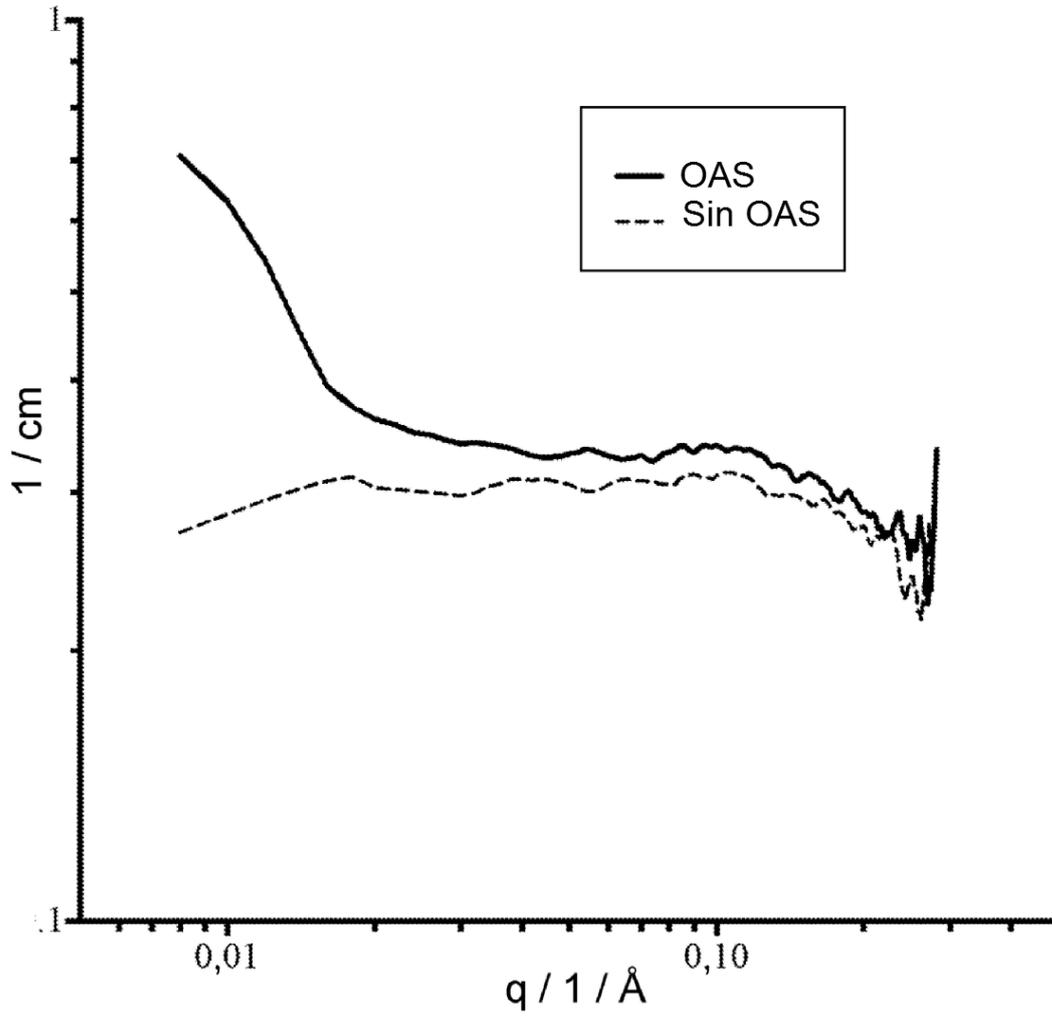


Figura 3

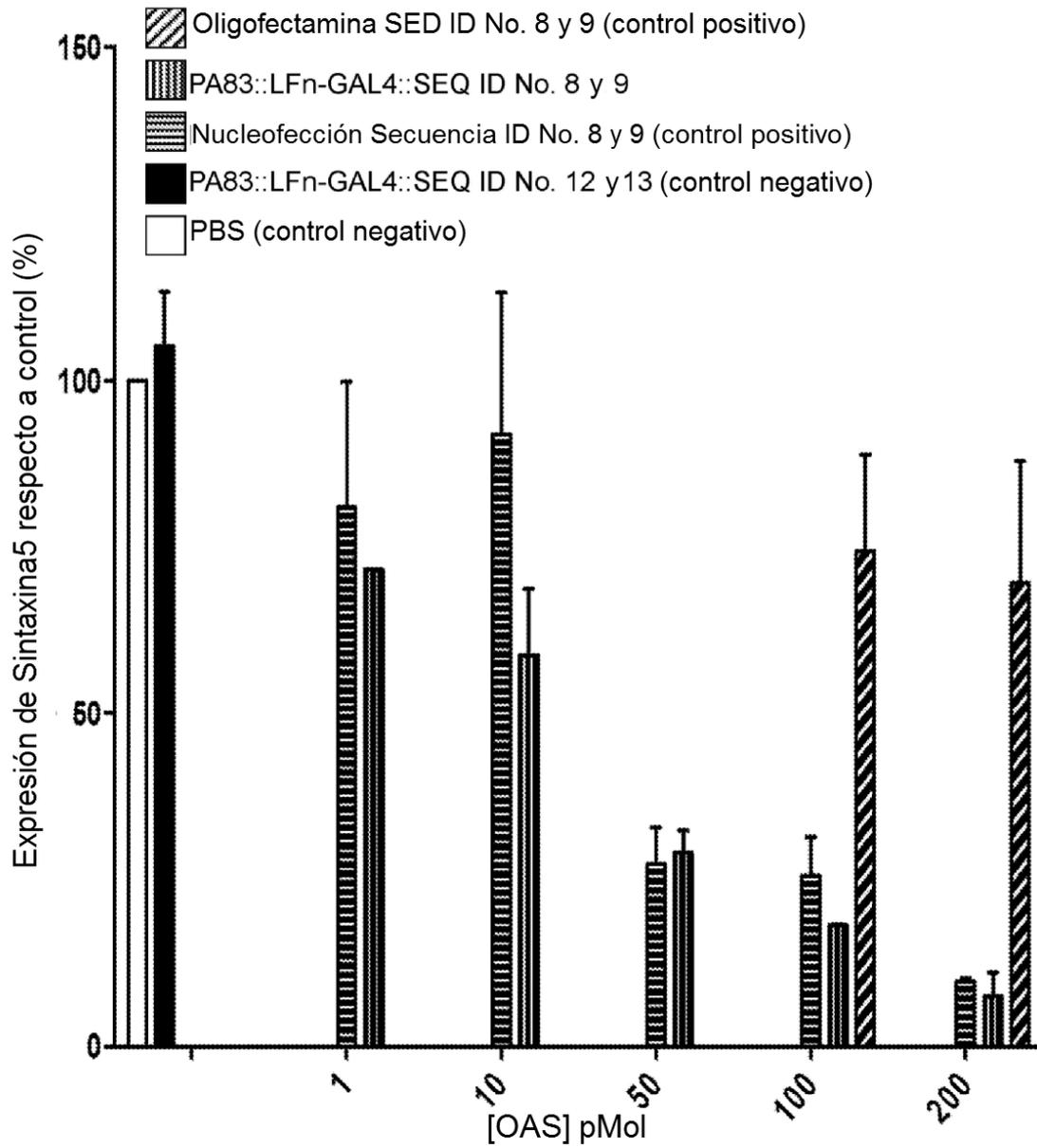


Figura 4

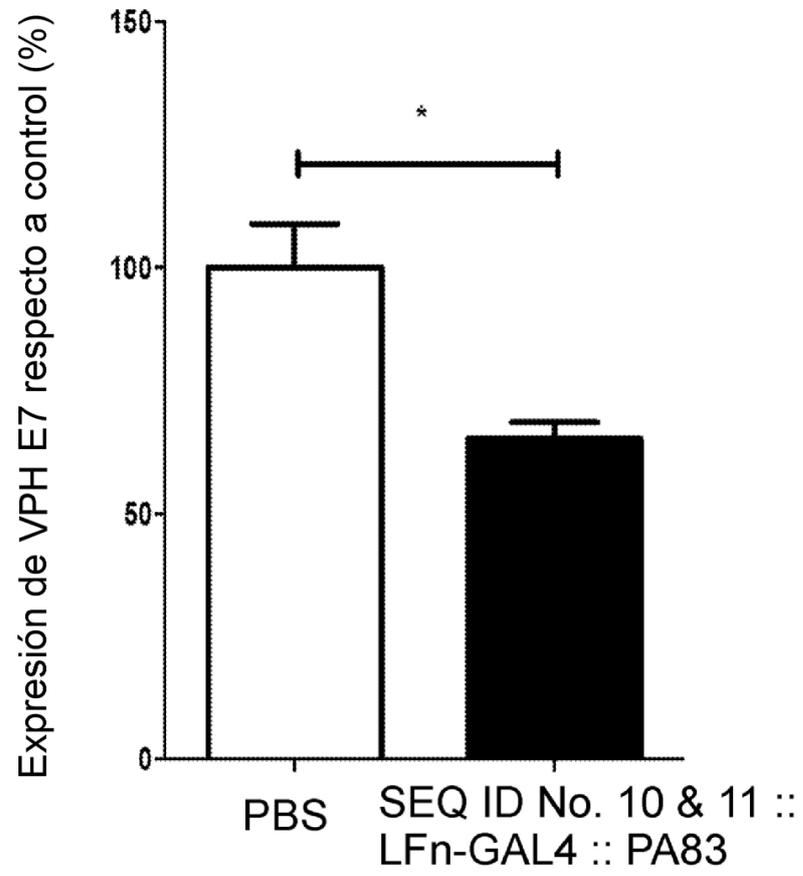


Figura 5

SEQ ID No: 1

ATGGAACGCAACAAAACCTCAGGAGGAACACCTGAAAGAGATCATGAAACACATTGTTAAAAT
CGAGGTGAAAGGCGAAGAAGCGGTTAAAAAGGAGGCTGCCGAAAAGCTGCTGGAGAAGGT
ACCGTCTGATGTGCTGGAAATGTATAAAGCGATTGGTGGCAAAATCTACATCGTGGATGGTGAT
ATTACCAAACACATCTCCCTGGAAGCACTGAGCGAAGACAAGAAGAAGATCAAAGATATCTAC
GGCAAGGACGCGCTGCTGCACGAGCATTACGTTTACGCAAAAAGAAGGTTACGAACCGGTGCT
GGTTATCCAGTCCAGCGAGGATTACGTGCAAAATACGGAAAAAGCTCTGAACGTATATTACGA
AATTGGTAAAATCCTGTCTCGTGACATTCTGAGCAAAATTAACCAACCTTATCAGAAGTTCCTG
GACGTTCTGAACACCATCAAAAACGCTTCTGACTCCGACGGCCAGGACCTGCTGTTCACTAAT
CAGCTGAAAGAACATCCGACCGATTTCTCTGTAGAATTCTGGAACAGAACTCTAACGAGGTC
CAAGAAGTTTTTGCCAAAGCATTGCGTACTACATCGAGCCGCAGCATCGCGACGTGCTGCAG
CTGTACGCTCCAGAAGCCTTCAACTATATGGACAAATTCAATGAACAAGAAATCAACCTGTCTA
TGAAACTGCTGTCCTCCATCGAACAGGCTTGCGATATCTGTCGTCTGAAGAAACTGAAATGCTC
TAAAGAAAAACCGAAATGCGCGAAATGCCTGAAAAACAACCTGGGAATGTCGCTATTCCTAA
AACCAACGTTCTCCACTGACCCGTGCGCACCTGACCGAAGTAGAATCCCGTCTGGAACGCT
GGAGCAGCTGTTTCTGCTGATTTTCCCGCTGAAGACCTGGACATGATCCTGAAAATGGATAG
CCTGCAGGATATCAAAGCACTGCTGACCGGTCTGTTTGTGCAGGACAACGTCAACAAAGACG
CTGTTACTGATCGCCTGGCGAGCGTTGAAACTGATATGCCGCTGACCCTGCGTCAGCACCGTAT
CTCCGCAACGAGCTCCAGCGAAGAATCTAGCAACAAAGGTCAGCGCCAGCTGACCGTTAGC

Figura 6

SEQ ID No: 2

MERNKTQEEHLKEIMKHIVKIEVKGEEAVKKEAAEKLEKVPDVLVEMYKAIGGKIYIVDGDITKHI
SLEALSEDKKKIKDIYGKDALLHEHYVYAKEGYEPLVIQSSDYVENTEKALNVVYEIGKILSRDILSK
INQPYQKFLDVLNTIKNASDSDGQDLLFTNQLKEHPTDFSVEFLEQNSNEVQEVFAKAFAYYIEPQ
HRDVLQLYAPEAFNYMDKFNEQEINLS

Figura 7

SEQ ID No: 3

MKLLSSIEQACDICRLKLLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQLF
LLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNVKNDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSEE
SSNKGQRQLTVS

Figura 8

SEQ ID No: 4

ATGTAAACCGATTCCGAACCCGCTGCTGGGCCTGGACTCTACTATGGAACGCAACAAACTCA
GGAGGAACACCTGAAAGAGATCATGAAACACATTGTTAAAATCGAGGTGAAAGGCGAAGAA
GCGGTTAAAAAGGAGGCTGCCGAAAAGCTGCTGGAGAAGGTACCGTCTGATGTGCTGGAAA
TGTATAAAGCGATTGGTGGCAAATCTACATCGTGGATGGTATATTACCAACACATCTCCCT
GGAAGCACTGAGCGAAGACAAGAAGAAGATCAAAGATATCTACGGCAAGGACGCGCTGCTG
CACGAGCATTACGTTTACGCAAAGAAGGTTACGAACCGGTGCTGGTTATCCAGTCCAGCGA
GGATTACGTCGAAAATACGGAAAAAGCTCTGAACGTATATTACGAAATTGGTAAAATCCTGTCT
CGTGACATTCTGAGCAAATAACCAACCTTATCAGAAGTTCCTGGACGTTCTGAACACCATCA
AAAACGTTCTGACTCCGACGGCCAGGACCTGCTGTTCACTAATCAGCTGAAAGAACATCCGA
CCGATTTCTCTGTAGAATTCTGGAACAGAACTCTAACGAGGTCCAAGAAGTTTTGCCAAAG
CATTCGCGTACTACATCGAGCCGACGATCGCGACGTGCTGCAGCTGTACGCTCCAGAAGCCT
TCAACTATATGGACAAATCAATGAACAAGAAATCAACCTGTCTATGAAACTGCTGTCCTCCATC
GAACAGGCTTGCGATATCTGTCGTCTGAAGAACTGAAATGCTCTAAAGAAAAACCGAAATGC
GCGAAATGCCTGAAAAACAACTGGGAATGTCGCTATTCCCCTAAAACCAAACGTTCTCCACTG
ACCCGTGCGCACCTGACCGAAGTAGAATCCCGTCTGGAACGTCTGGAGCAGCTGTTTCTGCTG
ATTTTCCCGCGTGAAGACCTGGACATGATCCTGAAAATGGATAGCCTGCAGGATATCAAAGCA
CTGCTGACCGGTCTGTTTGTGCAGGACAACGTCAACAAAGACGCTGTTACTGATCGCCTGGCG
AGCGTTGAAACTGATATGCCGCTGACCTGCGTCAGCACCGTATCTCCGCAACGAGCTCCAGC
GAAGAATCTAGCAACAAAGGTCAGCGCCAGCTGACCGTTAGCCACCACCATCACCACCACTAA
GG

Figura 9

SEQ ID No: 5

MGKPIPNPLLGLDSTMERNKTQEEHLKEIMKHIVKIEVKGEEAVKKEAAEKLEKVP
SDVLEMYKAI
GGKIYIVDGDITKHISLEALSEDKKKIKDIYKGDALLHEHYVYAKEGYEPV
LVIQSSDYVENTEKAL
NVYYEIGKILSRDILSKINQPYQKFLDVLNTIKNASDSGQDLLFTNQLKEHPT
DFSVEFLEQNSNE
VQEVFAKAFAYYIEPQHRDVLQYAPEAFNYMDKFNQEQEINLSMKLLSSIEQ
ACDICRLKCLKCSKE
KPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQLFLLIFPRED
LDMILKMDSLQDIKAL
LTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSESSNKGQRQLT
VSHHHHHH

Figura 10

SEQ ID No: 6

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGAAGTTAAACAGGAGAACCGGTTATTAAT
 GAATCAGAATCAAGTTCCCAGGGGTTACTAGGATACTATTTTAGTGATTTGAATTTCAAGCACCCAT
 GGTGGTTACCTCTTCTACTACAGGGGATTTATCTATTCTAGTTCTGAGTTAGAAAATATTCCATCGG
 AAAACCAATATTTTCAATCTGCTATTTGGTCAGGATTTATCAAAGTTAAGAAGAGTGATGAATATACA
 TTTGCTACTTCCGCTGATAATCATGTAACAATGTGGGTAGATGACCAAGAAGTGATTAATAAAGCTTC
 TAATTCTAACAAAATCAGATTAGAAAAAGGAAGATTATATCAAATAAAAATTCATATCAACGAGAA
 AATCCTACTGAAAAAGGATTGGATTTCAAGTTGACTGGACCGATTCTCAAATAAAAAAGAAGTG
 ATTTCTAGTGATAACTTACAATTGCCAGAATTAACAACAAAATCTTCGAACTCAAGAAAAAGCGAA
 GTACAAGTGCTGGACCTACGGTCCAGACCGTGACAATGATGGAATCCCTGATTCATTAGAGGTAG
 AAGGATATACGGTTGATGTCAAATAAAAAGAACTTTTTCTTCCACCATGGATTTCTAATATTCATGAA
 AAGAAAGGATTAACCAAATATAAATCATCTCCTGAAAAATGGAGCACGGCTTCTGATCCGTACAGTG
 ATTTGAAAAAGGTTACAGGACGGATTGATAAGAATGTATCACCAGAGGCAAGACACCCCCTTGTGG
 CAGCTTATCCGATTGTACATGTAGATATGGAGAATATTATTCTCTCAAAAAATGAGGATCAATCCACA
 CAGAATACTGATAGTCAAACGAGAACAATAAGTAAAAATACTTCTACAAGTAGGACACATACTAGTG
 AAGTACATGAAAATGCAGAAGTGCATGCGTCTTTGATATTGGTGGGAGTGTATCTGCAGGAT
 TTAGTAATTCGAATTCAGTACGGTCGCAATTGATCATTCACTATCTCTAGCAGGGGAAAGAAGTTG
 GGCTGAAACAATGGGTTAAATACCGCTGATACAGCAAGATTAATGCCAATATTAGATATGTAATA
 CTGGGACGGCTCCAATCTACAACGTGTTACCAACGACTTCGTTAGTGTTAGGAAAAAATCAAACAC
 TCGCGACAATTAAGCTAAGGAAAAACCAATTAAGTCAAATACTTGCACCTAATAATTATTATCCTTCT
 AAAAATTGGCGCCAATCGCATTAAATGCACAAGACGATTTCAAGTTCTACTCCAATTACAATGAATT
 ACAATCAATTTCTTGAGTTAGAAAAACGAAACAATTAAGATTAGATACGGATCAAGTATATGGGAA
 TATAGCAACATACAATTTGAAAATGGAAGAGTGAGGGTGGATACAGGCTCGAACTGGAGTGAAG
 TGTTACCGCAAATTCAGAAACAACGACGATCATTTTTAATGGAAAAGATTTAAATCTGGTAGA
 AAGGCGGATAGCGGCGGTTAATCCTAGTGATCCATTAGAAACGACTAAACCGGATATGACATTA
 AGAAGCCCTTAAATAGCATTGGATTAAACGAACCGAATGGAACTTACAATATCAAGGGAAAGA
 CATAACCGAATTTGATTTAATTCGATCAACAACATCTCAAATATCAAGAATCAGTTAGCGGAAT
 TAAACGCAACTAACATATACTGTATTAGATAAAATCAAATTAATGCAAAAATGAATTTTTAATAA
 GAGATAAACGTTTTCTATTATGATAGAAATAACATAGCAGTTGGGGCGGATGAGTCAGTAGTTAAGG
 AGGCTCATAGAGAAGTAATTAATTCGTCACAGAGGGATTATTGTTAAATATTGATAAGGATATAAG
 AAAAATATTATCAGGTTATATTGTAGAAATTGAAGATACTGAAGGGCTTAAAGAAGTTATAAATGAC
 AGATATGATATGTTGAATATTTCTAGTTTACGGCAAGATGGAAAAACATTTATAGATTTAAAAAATAT
 AATGATAAATTACCGTTATATAAGTAATCCAATTATAAGGTAAATGTATATGCTGTTACTAAAGAAA
 AACTATTATTAATCCTAGTGAGAATGGGGATACTAGTACCAACGGGATCAAGAAAATTTAATCTTT
 TCTAAAAAAGGCTATGAGATAGGATGA

Figura 11

SEQ ID No: 7

MRGSHHHHHHGSEVKQENRLLNESESSSQGLLYYFSDLNFQAPMVVTSSTTGDLSPSELENI
PSENQYFQSAIWSGFIKVKKSDEYTFATSADNHVTMWVDDQEVINKASNSNKIRLEKGRLYQIKI
QYQRENPTKGLDFKLYWTDSONKKEVISSDNLQPELKQKSSNSRKKRSTSAGPTVPDRDNDGI
PDSLEVEGYTVDVKNKRTFLSPWISNIHEKKGLTKYKSSPEKWSTASDPYSDFEKVTGRIDKNVSP
EARHPLVAAYPIVHVDMENIILSKNEDQSTQNTDSQTRTISKNTSTSRHTSEVHGNAEVHASFF
DIGGSVSAGFSNSNSSTVAIDHLSLAGERTWAETMGLNTADTARLNANIRYVNTGTAPIYNVLP
TTSVLGKNQTLATIKAKENQLSQILAPNNYYPSKNLAPIALNAQDDFSSTPITMNYNQFLELEKTK
QLRLDQVYGNIAFYNFENGRVVDVDTGSNWSEVLPQIQETTARIIFNGKDLNLVERRIAAVNPS
DPLETTKPDMLKEALKIAFGFNEPNGNLQYQGDITEFDNFQDQTSQNIKNQLAELNATNIYT
VLDKIKLNAKMNILIRDKRFHYDRNNAVGADESVVKEAHREVINSSTEGLLLIDKDIRKILSGYIV
EIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKKYNDKLPYISNPYKVNYYAVTKENTIINPSE
NGDTSTNGIKKILIFSCKGYEIG

Figura 12