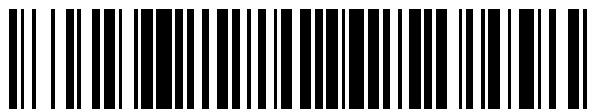


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 234**

51 Int. Cl.:

A61K 47/54	(2007.01) C12N 15/87	(2006.01)
A61K 47/55	(2007.01) C12N 15/88	(2006.01)
A61K 47/62	(2007.01) A61K 38/08	(2009.01)
A61K 47/64	(2007.01) A61K 38/10	(2006.01)
A61K 47/69	(2007.01) A61K 38/16	(2006.01)
C12N 15/113	(2010.01)	
A61K 31/713	(2006.01)	
A61K 38/12	(2006.01)	
A61K 38/17	(2006.01)	
A61P 31/04	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2011 PCT/GB2011/050263**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2011 WO11098829**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2011 E 11703728 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2533815**

54 Título: **Complejos de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

12.02.2010 US 304087 P
12.02.2010 GB 201002413

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.07.2019

73 Titular/es:

PROCARTA BIOSYSTEMS LTD (100.0%)
Norwich Bio-Incubator Norwich Research Park
Colney Lane
Norwich, Norfolk NR4 7UH, GB

72 Inventor/es:

MCARTHUR, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 719 234 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

Complejos de ácidos nucleicos

La presente invención se refiere a complejos de secuencias de ácido nucleico. En particular, la presente invención se refiere a complejos de señuelos de factores de transcripción, su suministro a bacterias y su formulación.

- 5 El control del crecimiento y la virulencia bacterianos plantea un problema creciente, particularmente en aplicaciones médicas y veterinarias, y puede convertirse en un desafío importante para la salud pública. Los antibióticos que se usan contra bacterias patógenas son muy conocidos en la técnica. Sin embargo, el uso extendido de tales antibióticos ha conducido a la aparición de bacterias que son resistentes a, al menos, un antibiótico y, en algunos casos, a múltiples antibióticos (denominadas cepas resistentes a múltiples fármacos). La situación se ve agravada por una disminución en la cantidad de antibióticos convencionales que se están descubriendo y que están en desarrollo. De hecho, la resistencia a los antibióticos es un gran desafío para la investigación antibacteriana y amenaza la potencia de los antibióticos comercializados, así como los que aún están en desarrollo. En consecuencia, existe una necesidad de nuevos agentes antibacterianos que puedan usarse para combatir las propagaciones e infecciones bacterianas.
- 10 Las terapias basadas en ADN tienen el potencial de superar las limitaciones de las terapias antibacterianas existentes porque pueden diseñarse para tratar potencialmente cualquier patógeno, ya sea evitando la expresión de genes que codifican un mecanismo de resistencia a antibióticos o inhibiendo el crecimiento modificando la expresión de genes esenciales o adaptativos, u perones o, de forma similar, evitando la aparición de virulencias o patogenicidades. Además, es poco probable que las bacterias desarrollen resistencia a estos agentes, ya que éstas requerirían mutaciones simultáneas que afectarían tanto al factor de transcripción como a su sitio o a sus sitios de unión afines. Esto es particularmente cierto para los agentes que controlan varios genes esenciales. Alternativamente, un gen podría evadir el control mediado por el señuelo del factor de transcripción mediante mutación, de modo que el gen se exprese de forma constitutiva. Sin embargo, en el caso de un señuelo del factor de transcripción que actuara simultáneamente en muchos genes, se requeriría que muchos de esos genes adquirieran mutaciones para convertirlos en expresión constitutiva, un evento considerado poco probable.
- 15 20 25

Los señuelos del factor de transcripción (TFD) son uno de esos agentes terapéuticos basados en el ADN. Los oligonucleótidos señuelo están diseñados para imitar los sitios de unión de los factores de transcripción y evitar que estos últimos se unan a sus dianas genómicas afines, con la consiguiente modificación de la expresión génica (Mann and Dzau (2000) J. Clin. Investigation 106: 1071-1075).

- 30 Los TFD tienen claras ventajas respecto a otras terapias basadas en el ADN. Su mecanismo de acción es simple y predecible: controlan la expresión génica mediante el secuestro de factores de transcripción, evitando que estos últimos se unan a los promotores al inundar la célula con copias suficientes de las secuencias de unión específicas (de ahí el término "señuelos"). Esto contrasta con estrategias antisentido en las que las dianas son difíciles de definir debido a la compleja estructura secundaria del ARNm. En comparación con los enfoques antisentido, los TFD tienen las ventajas adicionales de que actúan rápidamente, impidiendo la expresión de genes, mientras que los enfoques antisentido tratan con las consecuencias de la expresión. Por lo tanto, los TFD son efectivos a concentraciones mucho más bajas, ya que una sola interacción TFD-factor de transcripción puede bloquear la transcripción de un solo gen que, por otra parte, podría haber dado lugar a muchos miles de copias de ARNm, que constituyen las dianas para el enfoque antisentido.
- 35 40 45
- Otras terapias basadas en el ADN incluyen plásmidos que contienen transgenes para terapia génica, oligonucleótidos para aplicaciones antisentido y antigénicas (Crooke S.T. (1998) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 8: 115-122), ribozimas, ADNzimas, aptámeros y pequeños ARN interferentes (siRNAs) (Stull R.A. et al (1995) Pharm Res. 12: 465-483; Patil S.D. and Burgess D.J. (2003) AAPS Newsmagazine 6: 27). Aunque la mayoría de los fármacos basados en el ADN se encuentran en desarrollo preclínico o en las primeras etapas de los ensayos clínicos, esta clase de compuestos surgió en los últimos años para ofrecer candidatos extremadamente prometedores para terapias con medicamentos en una amplia gama de enfermedades, como el cáncer, el SIDA, trastornos neurológicos como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer y trastornos cardiovasculares.

- 50 El documento WO2008/024389 describe composiciones de cocleato que incluyen un nucleótido, tal como un TFD o ARNip, asociado con un anfífilo cargado positivamente.

Sin embargo, el suministro de terapias basadas en ADN, incluidos los TFD, sigue siendo un desafío importante. Las membranas celulares son uno de los principales obstáculos encontrados cuando se suministran grandes agentes terapéuticos hidrófilos, como proteínas o ácidos nucleicos. El mayor esfuerzo para resolver este problema se centra en el suministro a células eucariotas, para desarrollar terapias eficaces para el cáncer humano y similares.

- 55 En los eucariotas, los diferentes compartimentos celulares (incluido el núcleo) están protegidos por membranas biológicas que segregan los distintos compartimentos celulares y evitan la entrada y salida de solutos de las células y orgánulos. Aunque estas barreras son esenciales para el mantenimiento de la célula, son un problema importante cuando se trata de administrar terapias a células individuales u orgánulos específicos dentro de las células.

La mayoría de los cationes no pueden pasar a través de las membranas celulares sin sistemas portadores específicos debido a la gran barrera de energía libre que presenta el interior hidrófobo de la membrana. Para ser acumulado y retenido selectivamente por una célula, un compuesto catiónico requiere suficiente lipofilia y deslocalización de sus cargas positivas para reducir el cambio de energía libre cuando se pasa de un ambiente acuoso a uno hidrofóbico. Esto permite que el compuesto atraviese pasivamente el plasma y las membranas mitocondriales y se acumule en respuesta al potencial de membrana.

El transporte de proteínas a las células eucariotas está mediado principalmente por la endocitosis. Este es un sistema de transporte altamente organizado en el que las grandes moléculas polares se absorben al ser envueltas en la membrana celular. La fagocitosis y la pinocitosis son formas de endocitosis no mediadas por receptores, mientras que la endocitosis mediada por receptores es un evento activo más específico en el que la membrana del citoplasma se pliega hacia adentro para formar orificios recubiertos. En este caso, las proteínas u otras partículas desencadenantes se bloquean en los receptores/ligandos de la membrana plasmática de la célula o por interacción no específica con la superficie de la célula, por ejemplo, debido a las interacciones de carga. Solo entonces las partículas son envueltas. Estas vesículas que brotan hacia el interior brotan para formar vesículas citoplásmicas.

Se han desarrollado varias técnicas para trasladar moléculas biológicamente activas a través de estas barreras *in vivo* e *in vitro*. La electroporación y la microinyección son tediosas y poco prácticas para usar *in vivo* porque estos métodos requieren la ruptura de la membrana celular antes de que puedan introducirse sustancias en la célula y, por lo tanto, se limitan a una cantidad concreta de células.

Si bien el uso de la vía por endocitosis es atractivo, un inconveniente importante es garantizar la liberación endosómica antes de que se produzca la actividad lisosómica. La encapsulación de liposomas y la endocitosis mediada por receptores también están limitadas por su falta de reconocimiento y bajo rendimiento en el suministro. La mayor parte del trabajo exploratorio realizado hasta la fecha se ha centrado en el suministro de moléculas de ARNip a células eucariotas. El enfoque que suele adoptarse es formar liposomas o complejos con péptidos de reconocimiento unidos covalentemente que dirigen el agente terapéutico a la diana apropiada dentro de la célula.

Hay muchas consideraciones al seleccionar el componente lipídico para tal mecanismo de administración. El componente tipo lipídico es generalmente catiónico y tiene tres funciones:

1. condensar el ácido nucleico para que el suministro sea más alcanzable;
2. proteger el ácido nucleico de la degradación por nucleasas o por la absorción no específica por proteínas plasmáticas, etc., y
3. proteger la carga negativa del esqueleto de fosfato.

El tercer punto se puede superar mediante el uso de estructuras sintéticas con menos carga o sin carga.

Además, los liposomas o complejos requieren ciertas propiedades físicas ideales:

1. Buena estabilidad, tanto en sal como en fluidos biológicos. Esto se puede cuantificar con el potencial ξ que mide la atracción o repulsión entre las partículas;
2. Distribución estrecha de tamaño, para bacterias idealmente entre 50 y 100 nm;
3. Menor toxicidad, aunque la mayoría de los agentes de transfección (lípidos, cationes lipófilos) muestran niveles moderados de toxicidad;
4. Práctico para producir, incorporando aspectos como el coste de los bienes.

En general, se sabe que los péptidos utilizados para el suministro eucariótico permeabilizan las membranas, que penetran en las células a través de receptores específicos en las células diana, o simplemente que son catiónicos (por ejemplo, la poliarginina). El uso de péptidos con propiedades de penetración celular tiene varias ventajas, que se deben principalmente a las diversas modificaciones que se pueden realizar en la secuencia peptídica. Esto permite la ingeniería de portadores que abordan diferentes subdominios celulares y/o que pueden transportar diversos tipos de cargas.

Una clase de agentes de translocación de membrana son los péptidos que penetran en las células (CPPs). Además de ser una herramienta suave y efectiva para el acceso a diferentes orgánulos celulares *in vitro*, los CPP se han utilizado para el suministro celular de varios agentes *in vivo*, con resultados prometedores.

Los CPP generalmente consisten en menos de 30 aminoácidos, tienen una carga neta positiva y tienen la capacidad de translocar la membrana plasmática y transportar varias cargas diferentes hacia el citoplasma y el núcleo de una manera aparentemente independiente de la energía. La translocación se produce a través de un mecanismo todavía desconocido que no se ve afectado por los diversos inhibidores de la endocitosis o por bajas temperaturas (Langel, Ü., ed. (2002) Cell-Penetrating Peptides, Processes and Applications, CRC Press).

El término CPP incluye péptidos sintéticos permeables a las células, dominios de transducción de proteínas y secuencias de translocación de membrana, que tienen la capacidad de translocar la membrana celular y obtener acceso al interior celular.

5 Otras clases de péptidos con el potencial de afectar el suministro especialmente a las bacterias son aquellos con propiedades antibacterianas. Estos incluyen los péptidos antimicrobianos (AMP, por sus siglas en inglés), los péptidos que penetran en las células (CPP, por sus siglas en inglés), aquellos péptidos que no se sintetizan mediante ribosomas y los glucopéptidos. Todos estos tipos de péptidos se denominan en el presente documento proteínas antibacterianas (ABP).

10 Los AMP pueden derivarse de fuentes bacterianas, donde se las denomina bacteriocinas, o de fuentes eucariotas superiores, incluidos los seres humanos, los anfibios, los insectos, etc. Los AMP de interés particular son aquellos que pueden aumentar la permeabilidad de las membranas biológicas o tener la capacidad de translocarse a través de las membranas para alcanzar sus dianas intracelulares. Los AMP generalmente se dividen en cinco subgrupos que no se excluyen mutuamente en función de las similitudes estructurales (Brogden, 2005 Nat. Rev. Microbiol. 3: 238-250):

- 15 1. Los péptidos aniónicos son pequeños péptidos comúnmente complejados con zinc y activos contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas;
2. Los péptidos α -helicoidales catiónicos lineales (tales como buforina), que tienen menos de 40 aminoácidos de longitud, carecen de cisteínas y presentan una región de bisagra central entre dos regiones alfa-helicoidales;
- 20 3. Péptidos catiónicos que están enriquecidos para aminoácidos específicos, como las apidaecinas ricas en prolina y arginina;
4. Péptidos aniónicos y catiónicos que forman láminas beta debido a la formación de enlaces disulfuro entre grupos cisteína;
5. Péptidos aniónicos y catiónicos que son fragmentos de proteínas más grandes.

25 Los mecanismos por los cuales los AMP afectan a la destrucción microbiana son variados y no se limitan a ciertos subgrupos. La mayoría mata las bacterias formando poros en sus membranas, lo que hace que las células sean permeabilizadas. Se piensa que existen tres mecanismos distintos de permeabilización, que pueden ser una propiedad específica de un péptido o un efecto de la concentración del péptido utilizado:

1. Formación de poros torroidales, por ejemplo, magainina, melitina;
2. Formación de alfombras, por ejemplo, mediante dermaseptina S, cecropina o melitina;
- 30 3. Formación de duelas de barrica, por ejemplo, mediante alameticina.

Se han descrito varios AMP en los que el objetivo final no es la membrana sino la naturaleza intracelular, lo que requiere que el AMP se traslade a través de la membrana. Esta capacidad de translocación es de particular interés, ya que estos péptidos, o péptidos sintéticos modelados en ellos, podrían usarse para suministrar cargas alternativas como agentes terapéuticos. Por lo tanto, estos AMP pueden clasificarse según sus modos de eliminación intracelular:

- 35 1. Unión de ácidos nucleicos mediante, por ejemplo, buforina, buforina II y análogos y taquipesina;
2. Floculación de contenidos intracelulares, por ejemplo, mediante péptidos aniónicos;
3. Formación de tabiques, por ejemplo, mediante microcina 25;
4. Síntesis de la pared celular mediante, por ejemplo, mersacidina;
- 40 5. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos mediante, por ejemplo, pleurocidina y dermaseptina;
6. Inhibición de la síntesis de proteínas mediante, por ejemplo, pleurocidina y dermaseptina;
7. Inhibición de la actividad enzimática, por ejemplo, mediante apidaecinas.

45 Los péptidos sintetizados sin usar los ribosomas pueden ser estructuralmente diversos. A menudo están ciclados o ramificados, contienen aminoácidos no estándar o aminoácidos que se han modificado para producir hidroxialanina o hidroxiserina, y pueden someterse a una hidroxilación, halógenoación o glicosilación (Walsh et al (2004) Science 303: 1805-1810). La mayoría de estos péptidos inhiben el crecimiento de bacterias al permeabilizar sus membranas.

Los desafíos de la administración de péptidos y ácidos nucleicos a las bacterias son similares a los encontrados con las células eucariotas, pero los componentes celulares son diferentes. En particular, las bacterias no tienen un mecanismo endocítico para ayudar a trasladar al agente terapéutico dentro de la célula. Sin embargo, una clara

ventaja es que las bacterias no tienen un compartimento nuclear, por lo que es suficiente administrar el agente terapéutico en el citoplasma para que pueda acceder al genoma bacteriano. Por lo tanto, es necesario desarrollar alternativas a los sistemas de administración eucariótica. Estos implican encontrar formas de conseguir la entrada a la célula mediante la permeabilización de la membrana o membranas. En un entorno de laboratorio, el suministro de ADN a las células (transfección) se logra ya sea tratando a las células con tampones aniónicos, que rompen las membranas celulares al interferir con la distribución de la carga, en general con tampones que contienen iones de calcio. Alternativamente, se usa la electroporación, donde las células se preparan en tampones con baja conductancia y se usan altos voltajes para producir poros transitorios en las membranas bacterianas de algunas de las células, aunque de ninguna manera todas, lo que resulta en la transfección de una minoría de las células.

- 10 Evidentemente, es poco práctico utilizar cualquiera de los dos métodos para administrar terapias de ADN a las bacterias, ya sea en modelos animales o en un entorno clínico. La transfección *in vivo* se puede lograr conjugando el agente terapéutico con un péptido catiónico sintético o ABP que se sabe que daña las membranas y causa la entrada a través de los poros o extrusiones posteriores. Además, la capacidad de algunos de los ABP para translocarse a través de membranas es otra alternativa en el desarrollo de una estrategia de suministro creíble.
- 15 A partir del modelo eucariótico de uso de péptidos de administración, las características ideales para los péptidos de administración bacteriana incluyen:

1. especificidad/preferencia bacteriana, que se optimiza para procariotas en lugar de eucariotas;
2. baja probabilidad de provocar resistencia. Los péptidos catiónicos, por ejemplo, pueden oponer resistencia mediante MRSA que altera la densidad de carga de su membrana externa;
3. actividad de amplio espectro para su uso como un sistema de administración general a las bacterias; y
4. baja o nula toxicidad del huésped.

Del mismo modo, el uso de moléculas de transporte similares a los lípidos debe adaptarse a la construcción específica de la membrana bacteriana. Por ejemplo, las bacterias gramnegativas tienen una membrana externa e interna, las cuales deben superarse antes de que el agente terapéutico entre dentro de la bacteria.

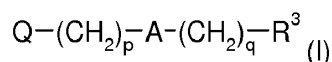
- 25 En este contexto, la presente invención proporciona una solución para la formulación y el suministro de secuencias de ácido nucleico, tales como TFD, a bacterias.

Específicamente, la presente invención se basa en un complejo antibacteriano que comprende una secuencia de ácido nucleico y uno o más restos de administración según las reivindicaciones. La secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de un sitio de unión celular nativo para un factor de transcripción bacteriano.

- 30 Los inventores han descubierto que los restos de suministro que tienen alguna actividad antibacteriana por sí mismos son ideales. En particular, el resto o restos de administración deben mostrar algún efecto antibacteriano sinérgico cuando se combinan con la secuencia de ácido nucleico. En otras palabras, la combinación del resto de administración y la secuencia de ácido nucleico debería mostrar un efecto antibacteriano mejorado al compararla con el efecto de la secuencia de ácido nucleico o el resto de administración solo.

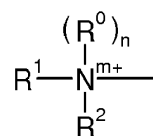
- 35 Se describen en este documento restos de administración que son compuestos de amina cuaternaria y bis-aminoalcanos y sus derivados insaturados, en donde el término "aminoalcanos", como se usa en este documento, se refiere a grupos amino (preferiblemente grupos amino terciarios) que forman parte de un anillo heterocíclico.

Ejemplos de tales compuestos son los compuestos de fórmula (I):



- 40 en donde Q se selecciona de:

(a) un grupo Q^1 que tiene la fórmula:



y

- 45 (b) un grupo Q^2 , Q^2-NH- , Q^2-O- , o Q^2-S- en donde Q^2 se selecciona entre grupos heteroaromáticos monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos de 5 a 14 miembros del anillo, de los cuales 1, 2 ó 3 son miembros del anillo de heteroátomo seleccionados de N, O y S, siempre que haya al menos un miembro del anillo de nitrógeno, en donde los grupos

heteroaromáticos están opcionalmente sustituidos por uno o dos sustituyentes R^{4a} y en donde dicho miembro de un anillo de nitrógeno puede formar un N-óxido o puede estar sustituido con alquilo C_{1-4} , fenil-alquilo C_{1-4} o di-fenil-alquilo C_{1-4} para formar un grupo cuaternario, en donde los restos fenilo en cada caso están opcionalmente sustituidos con uno o dos grupos halógeno, metilo o metoxi;

5 m es 0 ó 1;

n es 0 ó 1;

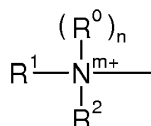
p y q son iguales o diferentes y cada uno es un número entero de 1 a 12;

10 A es un enlace o se selecciona entre un naftaleno, bifenilo, terfenilo, fenantreno, fluoreno, estilbeno, un grupo $C_6H_4(CH_2)_rC_6H_4$, un grupo $C_6H_4-C\equiv C-C_6H_4$, un grupo piridina-2,6-diil-bis(benceno-1,4-diilo), un grupo $CH=CH-(CH_2)_s-(CH=CH)_t$; y un grupo $C\equiv C-(CH_2)_u-(C\equiv C)_v$; en donde r es 0-4, s es 0 a 4, t es 0 ó 1; u es 0-4 y v es 0 ó 1;

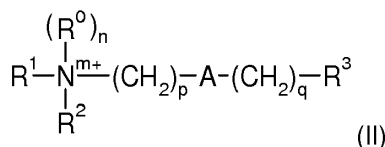
15 cuando n es 1, R^0 , R^1 y R^2 se seleccionan cada uno de entre alquilo C_{1-4} ; y cuando n es 0, entonces N, R^1 y R^2 forman juntos un grupo heteroaromático monocíclico, bicíclico o tricíclico de 5 a 14 miembros del anillo, de los cuales uno es el átomo de nitrógeno N y 0, 1 ó 2 son miembros adicionales del anillo del heteroátomo seleccionados de N, O y S, y en el que el grupo heteroaromático está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes R^{4b} ; y R^3 se selecciona de hidrógeno, alquilo C_{1-4} , halógeno, grupos carbocíclicos monocíclicos de 3 a 7 miembros del anillo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes R^{4c} , un grupo Q; un grupo $-NH-Q^2$, un grupo $-O-Q^2$ y un grupo $-S-Q^2$; y

20 R^{4a} , R^{4b} and R^{4c} son iguales o diferentes y cada uno se selecciona de alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor; alcoxi C_{1-4} opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor; nitro; amino; mono- y di-alquilamino C_{1-4} ; halógeno; fenil-alquilo C_{1-2} en el que el resto fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes metoxi, metilo o halógeno; ureido y guanidinilo.

En un ejemplo, Q es un grupo Q^1 :



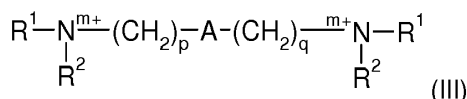
Por consiguiente, un subgrupo preferido de compuestos dentro de la fórmula (I) está representado por la fórmula (II):



25

en donde R^1 , R^2 , m, p, A, q y R^3 son como se definen con respecto a la fórmula (I).

Un subgrupo de compuestos dentro de la fórmula (II), en donde R^3 es Q^1 y n en cada caso es 0, puede representarse por la fórmula (III):



30 en donde R^1 , R^2 , m, p, A y q son como se definen con respecto a la fórmula (I).

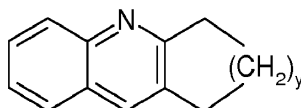
En los compuestos de fórmulas (I), (II) y (III), cuando m es 1, el átomo de nitrógeno N debe ser un nitrógeno cuaternario. Por consiguiente, los compuestos de fórmulas (I), (II) y (III) en donde m es 1 comprenderán uno o más aniones como contraiones, por ejemplo, aniones derivados de ácidos minerales, ácidos sulfónicos y ácidos carboxílicos.

35 Cuando N, R^1 y R^2 forman juntos un grupo heteroaromático monocíclico, bicíclico o tricíclico de 5 a 14 miembros del anillo, típicamente el grupo contiene el átomo de nitrógeno N como el único miembro del anillo del heteroátomo o contiene un segundo miembro del anillo del heteroátomo seleccionado de N, O y S.

40 Cuando N, R^1 y R^2 forman juntos un grupo heteroaromático monocíclico, bicíclico o tricíclico, el átomo de nitrógeno N forma parte de un anillo aromático. Los grupos heteroaromáticos preferidos son anillos aromáticos monocíclicos; anillos heterocíclicos bicíclicos en los que ambos anillos son aromáticos; anillos heterocíclicos bicíclicos en los que un anillo que contiene nitrógeno es aromático y el otro anillo no es aromático; y anillos tricíclicos en los que dos

anillos, incluido un anillo que contiene nitrógeno, son aromáticos y el otro anillo no es aromático.

Cuando N, R¹ y R² forman juntos un grupo heterocíclico monocíclico, bicíclico o tricíclico de 5 a 14 miembros del anillo, el grupo heterocíclico se selecciona preferiblemente de quinolina; isoquinolina; acridina; tetrahydroacridina y sus homólogos de anillo; piridina; benzoimidazol; benzoxazol y benzotiazol. Por homólogos en el anillo de tetrahydroacridina se entiende compuestos que contienen la estructura central:



en donde y es 1 ó 3. Por tetrahydroacridina se entiende un compuesto que tiene la estructura central anterior en la que y es 2.

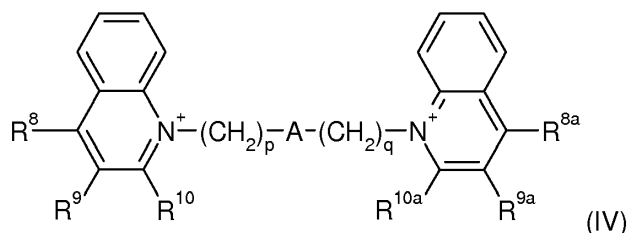
En un ejemplo, el resto de administración es un derivado cuaternario de quinolina o acridina, en particular 1,2,3,4-tetra-hidro-9-amino-acridina. Derivados adecuados de 1,2,3,4-tetra-hidro-9-amino-acridina se describen en la patente de EE.UU. N° US 3519631. De particular interés son los compuestos y fórmulas ejemplificadas en los Ejemplos 17 a 25 de la patente de EE.UU. N° US 3519631 y sus análogos. Los derivados de quinolina adecuados son los compuestos de bis-quinolinio, tales como el dequalinio, y sus análogos.

El dequalinio (Figura 1) es un compuesto de bis-quinolinio, tiene propiedades antimicrobianas leves y se ha usado durante 30 años como agente antimicrobiano en enjuagues bucales sin receta, pomadas tópicas, enjuagues orales y vaginales y pastillas para el dolor de garganta. Es un agente bacteriano tópico y también se ha probado como inhibidor de los canales de calcio, un agente antifúngico (Ng et al. (2007) Bioorg. Medicinal Chem. 15: 3422-3429), un inhibidor de la tuberculosis (Gutierrez-Lugo et al. (2009) J. Biomol. Screen. 14: 643-652) y como inhibidor de la proteína quinasa C (PKC; Abeywickrama et al. (2006) Bioorg. Medicinal Chem. 14: 7796-7803).

El dequalinio también se ha utilizado para administrar productos terapéuticos basados en ADN y fármacos convencionales, como el paxcitol, a las mitocondrias en experimentos *in vitro*. En estos experimentos, se preparó dequalinio como bolasomas por el método de película seca. Es decir, el dequalinio se disuelve en un disolvente orgánico, como el metanol, se seca hasta finalizar al vacío y se vuelve a suspender en una solución acuosa, después de lo cual se sonica para formar bolasomas que posteriormente se mezclan con el ADN para formar complejos. Se ha demostrado que estos complejos son capaces de suministrar ADN a las mitocondrias mediante un mecanismo que se cree que involucra la fusión de los complejos con la membrana externa de las mitocondrias (Weissig and Torchilin 2001 Adv. Drug Delivery Rev. 49: 127-149; Weissig et al. 2001 J. Control. Release 75: 401-408). Aunque la estructura de la membrana de las mitocondrias no es equivalente a la que se produce en las bacterias, es similar. Esto plantea la posibilidad de que el dequalinio podría ser adecuado para administrar productos terapéuticos a las bacterias en un entorno *in vivo*. Sin embargo, los complejos formados con dequalinio son inestables con el tiempo en presencia de tampones fisiológicos y fluidos biológicos y de dilución.

Por lo tanto, el complejo puede comprender un análogo de dequalinio. De esta manera, es posible diseñar un compuesto de dequalinio que tenga una estabilidad mejorada (tanto para la dilución como para la presencia de sal) y, sin embargo, tenga perfiles de toxicidad similares o mejorados para el dequalinio. Se ha descrito un análogo de este tipo que forma complejos más estables (Compuesto 7, Galanakis et al. [J. Med. Chem. (1995) 35: 3536-3546]) según lo probado por varios parámetros fisicoquímicos, como la capacidad de unir el ADN a la exclusión del tinte fluorescente SYBR-verde, el tamaño de las partículas formadas según se mide mediante la dispersión dinámica de la luz y se visualiza con microscopía electrónica y su estabilidad en concentraciones elevadas de sal y en dilución y almacenamiento durante períodos prolongados (Weissig et al. (2001) S. T. P. Pharma Sciences 11: 91-96).

Ejemplos de dequalinio y sus análogos son compuestos de la fórmula (IV):



en donde:

p y q son iguales o diferentes y cada uno es un número entero de 1 a 12;

A es un enlace o se selecciona entre naftaleno, bifenilo, terfenilo, fenantreno, fluoreno, estilbeno, un grupo C₆H₄(CH₂)_rC₆H₄, un grupo C₆H₄-C≡C-C₆H₄, un grupo piridina-2,6-diil-bis(benceno)-1,4-diilo), un grupo CH=CH-(CH₂)_s-(CH=CH)-; y un grupo C≡C-(CH₂)_u-(C≡C)-; en donde r es 0-4, s es 0 a 4, t es 0 ó 1; u es 0-4 y v es 0 ó 1;

- R^8 , R^9 and R^{10} son iguales o diferentes y cada uno se selecciona de hidrógeno; alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor; alcoxi C_{1-4} opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor; nitro; amino; mono- y di- alquilamino C_{1-4} ; halógeno, fenil-alquilo C_{1-2} , en donde el resto fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes metoxi, metilo o halógeno; ureido y guanidinilo; o R^9 y R^{10} se unen entre sí para formar una cadena de alquileo $(CH_2)_w$ en donde w es de 3 a 5; y R^{8a} , R^{9a} y R^{10a} son iguales o diferentes y se selecciona cada uno entre hidrógeno; alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor; alcoxi C_{1-4} opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor; nitro; amino; mono- y di-alquilamino C_{1-4} ; halógeno, fenil-alquilo C_{1-2} en donde el resto fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes metoxi, metilo o halógeno; ureido y guanidinilo; o R^{9a} y R^{10a} se unen para formar una cadena de alquileo $(CH_2)_w$ en donde w es de 3 a 5.
- 5 Dentro de la fórmula (IV), un subconjunto de compuestos es el subconjunto en el que A es un enlace, un grupo $CH=CH-(CH_2)_s-(CH=CH)_t$; o un grupo $C\equiv C-(CH_2)_u-(C\equiv C)_v$. Dentro de este subconjunto, preferiblemente A es un enlace, es decir, hay una cadena de alquileo saturada que se extiende entre los átomos de nitrógeno de los dos anillos de quinolina.
- 10 Cuando A es un enlace, típicamente la suma de p y q está en el intervalo de 3 a 22, preferiblemente en el intervalo de 6 a 20, y más preferiblemente de 8 a 18. Ejemplos particulares son compuestos en los que $p + q = 8$, o $p + q = 9$, o $p + q = 10$, o $p + q = 11$, o $p + q = 12$, o $p + q = 13$, o $p + q = 14$, o $p + q = 15$, o $p + q = 16$, o $p + q = 17$ o $p + q = 18$.
- 15 En cada una de las realizaciones anteriores y subconjuntos de compuestos, R^8 y R^{8a} se seleccionan cada uno preferiblemente de hidrógeno; alcoxi C_{1-4} ; nitro; amino; mono- y di-alquilamino C_{1-4} ; y guanidinilo.
- 20 Más preferiblemente, R^8 y R^{8a} se seleccionan cada uno de hidrógeno; alcoxi C_{1-4} ; amino y guanidinilo.
- Aún más preferiblemente, R^8 y R^{8a} se seleccionan cada uno de metoxi y amino.
- En un ejemplo, R^8 y R^{8a} son ambos amino.
- En otro ejemplo, R^8 y R^{8a} son ambos metoxi.
- En otro ejemplo, R^8 y R^{8a} son ambos guanidinilo.
- 25 En cada uno de los ejemplos y subconjuntos de compuestos anteriores, preferiblemente:
- R^9 es hidrógeno;
- R^{9a} es hidrógeno;
- R^{10} se selecciona de hidrógeno; amino; y alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;
- R^{10a} se selecciona de hidrógeno; amino; y alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;
- 30 o R^9 y R^{10} se unen para formar una cadena de alquileo $(CH_2)_w$ en donde w es de 3 a 5: y/o
- R^{9a} y R^{10a} se unen para formar una cadena de alquileo $(CH_2)_w$ en donde w es de 3 a 5.
- Más preferiblemente:
- R^9 es hidrógeno;
- R^{9a} es hidrógeno;
- 35 R^{10} se selecciona de hidrógeno; amino; metilo y trifluorometilo;
- R^{10a} se selecciona de hidrógeno; amino; metilo y trifluorometilo;
- o R^9 y R^{10} se unen para formar una cadena de alquileo $(CH_2)_w$ en donde w es de 3 a 5: y/o
- R^{9a} y R^{10a} se unen para formar una cadena de alquileo $(CH_2)_w$ en donde w es de 3 a 5.
- En un grupo de compuestos dentro de la fórmula (IV):
- 40 A es un enlace;
- la suma de p y q está en el intervalo de 8 a 18;
- R^8 y R^{8a} se seleccionan entre hidrógeno; alcoxi C_{1-4} ; amino y guanidinilo;
- R^9 es hidrógeno;

R^{9a} es hidrógeno;

R¹⁰ se selecciona de hidrógeno; amino; y alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;

R^{10a} se selecciona de hidrógeno; amino; y alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;

o R⁹ y R¹⁰ se unen para formar una cadena de alquileo (CH₂)_w en donde w es de 3 a 5: y/o

- 5 R^{9a} y R^{10a} se unen para formar una cadena de alquileo (CH₂)_w en donde w es de 3 a 5.

En otro grupo de compuestos dentro de la fórmula (IV):

A es un enlace;

la suma de p y q está en el intervalo de 8 a 18;

R⁸ y R^{8a} son cada uno guanidinilo;

- 10 R⁹ es hidrógeno;

R^{9a} es hidrógeno;

R¹⁰ se selecciona de hidrógeno; amino; y alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;

R^{10a} se selecciona de hidrógeno; amino; y alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;

o R⁹ y R¹⁰ se unen para formar una cadena de alquileo (CH₂)_w en donde w es de 3 a 5: y/o

- 15 R^{9a} y R^{10a} se unen para formar una cadena de alquileo (CH₂)_w en donde w es de 3 a 5.

En otro grupo de compuestos dentro de la fórmula (IV):

A es un enlace;

la suma de p y q está en el intervalo de 8 a 18;

R⁸ y R^{8a} se seleccionan entre hidrógeno; alcoxi C₁₋₄ y amino;

- 20 R⁹ es hidrógeno;

R^{9a} es hidrógeno;

R¹⁰ se selecciona de hidrógeno; amino; y alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;

R^{10a} se selecciona de hidrógeno; amino; y alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;

o R⁹ y R¹⁰ se unen para formar una cadena de alquileo (CH₂)_w en donde w es de 3 a 5: y/o

- 25 R^{9a} y R^{10a} se unen para formar una cadena de alquileo (CH₂)_w en donde w es de 3 a 5.

Dentro de este grupo, los compuestos más preferidos son aquellos en los que:

A es un enlace;

la suma de p y q está en el intervalo de 8 a 18;

R⁸ y R^{8a} se seleccionan entre hidrógeno; metoxi y amino;

- 30 R⁹ es hidrógeno;

R^{9a} es hidrógeno;

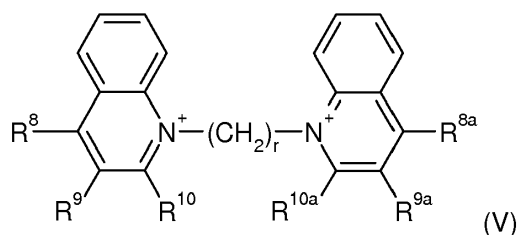
R¹⁰ se selecciona de hidrógeno; amino; metilo; y trifluorometilo;

R^{10a} se selecciona de hidrógeno; amino; metilo; y trifluorometilo;

o R⁹ y R¹⁰ se unen para formar una cadena de alquileo (CH₂)_w en donde w es de 3 a 5: y/o

- 35 R^{9a} y R^{10a} se unen para formar una cadena de alquileo (CH₂)_w en donde w es de 3 a 5.

El resto de liberación del complejo antibacteriano de la presente invención puede representarse por la fórmula (V):



en donde:

r es un número entero de 2 a 24;

R⁸, R⁹ y R¹⁰ son iguales o diferentes y cada uno se selecciona de hidrógeno; alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor; alcoxi C₁₋₄ opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor; nitro; amino; mono- y dialquilamino-C₁₋₄; halógeno, fenil-alquilo C₁₋₂, en donde el resto fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes metoxi, metilo o halógeno; ureido y guanidinilo; o R⁹ y R¹⁰ se unen para formar una cadena de alquileo (CH₂)_w en donde w es de 3 a 5; y R^{8a}, R^{9a} y R^{10a} son iguales o diferentes y se selecciona cada uno entre hidrógeno; alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor; alcoxi C₁₋₄ opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor; nitro; amino; mono- y di-alquilamino C₁₋₄; halógeno, fenil-alquilo C₁₋₂, en donde el resto fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes metoxi, metilo o halógeno; ureido y guanidinilo; or R^{9a} and R^{10a} se unen para formar una cadena de alquileo (CH₂)_w en donde w es de 3 a 5;

siempre que:

(i) cuando R¹⁰ y R^{10a} son ambos hidrógeno o ambos son metilo, y R⁹ y R^{9a} son ambos hidrógeno, entonces al menos uno de R⁸ y R^{8a} son distintos de hidrógeno, amino o dimetilamino; y

(ii) when R⁹ and R¹⁰ se unen para formar una cadena de alquileo (CH₂)_w en donde w is 4 and R^{9a} and R^{10a} se unen para formar una cadena de alquileo (CH₂)_w en donde w is 4, then at least one of R⁸ and R^{8a} is other than amino.

Preferiblemente, r es un número entero de 8 a 20, más preferiblemente de 10 a 18, por ejemplo cualquiera de 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

En un grupo de compuestos dentro de la fórmula (V), R⁸ y R^{8a} se seleccionan entre metoxi y guanidinilo. Dentro de este grupo de compuestos, R⁹ y R^{9a} son generalmente hidrógeno y R¹⁰ y R^{10a} se seleccionan típicamente de hidrógeno, metilo, trifluorometilo y amino.

En otro grupo de compuestos dentro de la fórmula (V), R⁸ y R^{8a} se seleccionan de hidrógeno, amino, mono- y di-alquilamino C₁₋₄; metoxi y guanidinilo; R⁹ y R^{9a}son ambos hidrógeno y R¹⁰ y R^{10a} son ambos trifluorometilo.

En otra realización, el análogo puede ser el dicloruro de 10,10'-(decano-1,10-diil) bis (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridinio) (Figura 2). Este compuesto se menciona en esta memoria descriptiva como el Compuesto 7 debido a su notación original en Galanakis et al. (J. Med. Chem. (1995) 35: 3536-3546) donde se estaba investigando como un posible inhibidor de los canales de calcio. El compuesto se probó posteriormente como un agente para la administración de terapias de ADN a las mitocondrias (Weissig et al. (2001) S. T. P. Pharma Sci. 11: 91-96) en cuya publicación se informó la estabilidad ventajosa de los complejos formados por el análogo del Compuesto 7. Un documento adicional (Weissig et al. (2006) J. Liposome Res. 16: 249-264) informaron que el análogo del Compuesto 7 tiene menor toxicidad *in vitro* en comparación con el dequalinio.

Como los análogos de dequalinio con cadenas alquílicas más largas mostraron una toxicidad aún menor, se consideraron análogos con diferentes longitudes de cadena (Weissig et al. (2006) J. Liposome Res. 16: 249-264). Por lo tanto, preferiblemente, la cadena de alquilo del análogo de dequalinio tiene entre 8 y 14 grupos metilo, pero con ejemplos de cadenas que contienen tan pocos como 3 grupos metilo (Galanakis et al (1996) J. Med. Chem. 39: 3592-3595) y otros cationes lipófilos que contienen hasta 36 grupos metilo en la cadena de alquilo (Eaton et al. (2000) Angew. Chem. Int. Ed. 39: 4063-4067). Más preferiblemente, la cadena de alquilo tiene 10 ó 12 grupos metilo. Por lo tanto, se diseñó un análogo del Compuesto 7 con 12 grupos metilo en la cadena de alquilo, denominado en este documento el Compuesto 7₁₂.

Otro análogo adecuado es el dicloruro de 10,10'-(dodecano-1,12-diil) bis(9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridinio) (Figura 3), denominado en lo sucesivo en este documento el Compuesto 7₁₂. El Compuesto 7₁₂ se deriva del Compuesto 7 y tiene una cadena de alquilo C₁₂, en lugar de la cadena de alquilo C₁₀ del Compuesto 7.

Otros análogos adecuados del dequalinio incluyen:

yoduro de 1-decanil-2-metil-4-aminoquinolinio
yoduro de 1-butil-2-metil-4-aminoquinolinio

- yoduro de 1,1,1-trietil-1-(10-yododecan-1-il)amonio
 diyoduro de 1-[1-(*N,N,N*-trietilamonio-1-il)-2-metil-4-aminoquinolinio
 diyoduro de 1,1'-(decano-1,10-diil)bis(4-aminopiridinio)
 cloruro de 1-(4-pentin-1-il)-4-aminopiridinio
- 5 dihidrato de dicloruro 1,1'-(deca-4,6-diino-1,10-diil)bis(4-aminopiridinio)
 2,2'-*N,N'*-(decano-1,10-diil)bis(2,4-diaminopiridina) [compuesto 8]
 2,2'-*N,N'*-(decano-1,10-diil)bis(2-aminopiridina)
 diyoduro de 2,2'-*N,N'*-(decano-1,10-diil)bis(1-metil-2-aminopiridinio)
 yoduro de 1-(4-pentin-1-il)-2-metil-4-aminoquinolinio
- 10 hidrato de diyoduro de 1,1'-(deca-4,6-diino-1,10-diil)bis(4-amino-2-metilquinolinio)
 diyoduro de 1,1'-(decano-1,10-diil)bis(quinolinio)
 hidrato de dibromuro de 1,1'-(decano-1,10-diil)bis(9-amino-1,2,3,4-tetra-hidroacridinio)
 2,2'-(decano-1,10-diil)bis(quinolina)
 hidrato de diyoduro de 2,2'-(decano-1,10-diil)bis(1-metilquinolinio)
- 15 2,2'-(decano-1,10-diil)bis(4-metoxiquinolona)
 diyoduro de 2,2'-(decano-1,10-diil)bis(1-metil-4-metoxiquinolinio)
 diyoduro de 2,2'-(dodecano-1,12-diil)bis(1-metilquinolinio)
 diyoduro de 2,2'-(decano-1,10-diil)bis(isoquinolinio)
 diyoduro de 1,1'-(decano-1,10-diil)bis(4-bromoisoquinolinio)
- 20 1,1'-(decano-1,10-diil)bis(1*H*-benzimidazol)
 hemihidrato de diyoduro de 1,1'-(decano-1,10-diil)bis(3-metilbenzimidazolio)
 1,1'-(decano-1,10-diil)bis(2-metilbenzimidazol)
 diyoduro de 1,1'-(decano-1,10-diil)bis(2,3-dimetilbenzimidazolio)
 dihidrato de dihidrocloruro de 1,10-bis[*N*-(acridin-9-il)amino]decano
- 25 diyoduro de 1,1'-(1,10-decanodiil)bis[4-amino-2-metil quinolinio]
 diyoduro de 1,1'-(1,10-decanodiil)bis[4-aminoquinolinio]
 diyoduro de 1,1'-(1,10-decanodiil)bis[4-*N,N*,dimetilaminoquinolinio]
 diyoduro de 1,1'-(1,10-decanodiil)bis[2-metilquinolinio]
 diyoduro de 1,1'-(1,10-decanodiil)bis[quinolinio]
- 30 diyoduro de 1,6-bis[*N*-(1-metilquinolinio-2-metil)amino]hexano
 diyoduro de 1,1'-(1,10-decanodiil)bis[1-amino isoquinolinio]
 diyoduro de 1,1'-(1,10-decanodiil)bis[2-metilbenzoxazolio]
 diyoduro de 1,1'-(1,10-decanodiil)bis[2-metilbenzotiazolio]
 diyoduro de 1,1'-(1,10-decanodiil)bis[2-amino-1-metilbenzimidazolio]
- 35 diyoduro de 1,1'-[(*E*)-5-deceno-1,10-diil]bis[4-amino-2-metilquinolinio]
 diyoduro de 1,1'-[(*Z*)-5-deceno-1,10-diil]bis[4-amino-2-metilquinolinio]
 diyoduro de 1,1'-(1,12-dodecanodiil)bis[4-amino-2-metilquinolinio]

- diyoduro de 1,1'-(1,14-tetradecanodil)bis[4-amino-2-metilquinolinio]
- diyoduro de 1,1'-(1,16-hexadecanodil)bis[4-amino-2-metilquinolinio], yoduro de *N*-decil-4-aminoquinaldinio
- 1,1'-[bifenil-3,3'-diilbis(metilen)]-bis(4-aminoquinolinio)
- hidrato de dibromuro (4), ditrifluoroacetato de 1,1'-[bifenil-4,4'-diilbis(metilen)]bis(4-aminoquinolinio)
- 5 hidrato etanoato de dibromuro de 1,1'-(fenantreno-3,6--diilbis(metilen)]bis(4-aminoquinolinio)
- ditrifluoroacetato de 1,1'-[fluoren-2,7-diilbis(metilen)]-bis(4-aminoquinolinio)
- hidrato de dibromuro de 1,1'-[metilenebis(benzeno-1,4-diilmetilen)]bis(4-aminoquinolinio)
- hidrato de dibromuro de 1,1'-[etilenbis-(benzeno-1,4-diilmetilen)]bis(4-aminoquinolinio)
- sesquihidrato de dibromuro de (*Z*)-1,1'-[estilbeno-4,4'-diilbis(metilen)]-bis(4-aminoquinolinio)
- 10 dihidrato de dibromuro de (*E*)-1,1'-[estilbeno-4,4'-diilbis(metilen)]bis-(4-aminoquinolinio)
- sesquihidrato de dibromuro de 1,1'-[etin-1,2-diilbis(benzeno-1,4-diilmetilen)]bis(4-aminoquinolinio)
- hemihidrato etanoato de dibromuro de 1,1'-[propano-1,3-diilbis(benzeno-1,4-diilmetilen)]bis(4-aminoquinolinio)
- hidrato de dibromuro de 1,1'-[piridina-2,6-diilbis(benzeno-1,4-diilmetilen)]-bis(4-aminoquinolinio)
- hidrato de dibromuro de 1,1'-[butano-1,4-diilbis(benzeno-1,4-diilmetilen)]bis-(4-aminoquinolinio)
- 15 trihidrato de dibromuro de 1,1'-[1,1:4',1"-terfenil-4,4"-diilbis(metilen)]bis(4-aminoquinolinio)
- hidrato de dibromuro de 1,1'-[naftaleno-2,6-diil(bis(metilen)]bis(4-aminoquinolinio)
- dihidrato de dibromuro de 1,1'-[benzeno-1,4-diilbis(metilen)]-bis(4-aminoquinolinio)
- hemihidrato de dibromuro de 1,1'-[benzeno-1,3-diilbis(metilen)]bis(4-aminoquinolinio)
- diyoduro de 1,1'-(propano-1,3-diil)bis(4-aminoquinolinio)
- 20 diyoduro de 1,1'-(butano-1,4-diil)bis(4-aminoquinolinio)
- diyoduro de 1,1'-(pentano-1,5-diil)bis(4-aminoquinolinio)
- diyoduro de 1,1'-(hexano-1,6-diil)bis(4-aminoquinolinio)
- diyoduro de 1,1'-(octano-1,8-diil)bis(4-aminoquinolinio)
- hemihidrato de dibromuro de 1,1'-(dodecano-1,12-diil)bis(4-aminoquinolinio)
- 25 1,10-bis[*N*-(2-metilquinolin-4-il)amino]decano
- 1,12-bis[*N*-(2-metilquinolin-4-il)amino]dodecano
- 1,10-bis[(2-metilquinolin-4-il)amino]decano
- 1,12-bis[(2-metilquinolin-4-il)amino]dodecano
- 1,10-bis(*N*-quinolin-4-ilamino)decano
- 30 4,4'-[decano-1,10-diilbis(oxi)]bis[quinolina]
- 4,4'-[decano-1,10-diilbis(tio)]bis[quinolina]
- 4,4'-Dodecano-1,12-diilbis[quinolina]
- 1,8-bis(*N*-quinolin-4-ildiamino)octano
- hidrato de diyoduro de 1,8-bis[*N*-(1-metilquinolinio-4-il)amino]octano
- 35 diyoduro de 1,10-bis[*N*-(1-metilquinolinio-4-il)amino]decano
- diyoduro de 4,4'-[decano-1,10-diilbis(oxi)]bis[1-metilquinolinio]
- hidrato de diyoduro de 4,4'-[decano-1,10-diilbis(tio)]bis[1-metilquinolinio] (10).

diyoduro de 1,1'-dimetil-4,4'-dodecano-1,12-diilbis[quinolinio]

4,4'-decano-1,10-diilbis[quinolina]

diyoduro de 1,1'-dimetil-4,4'-decano-1,10-diilbis[quinolinio]

dibromuro de 1,10-bis[N-(1-bencilquinolinio-4-il)amino]decano

5 bis(trifluoroacetato) de 1,10-bis[N-(1-bencil-2-metilquinolinio-4-il)amino]-decano

bis(trifluoroacetato) de 1,12-bis[N-(1-bencil-2-metilquinolinio-4-il)amino]-dodecano

bis(trifluoroacetato) de 1-[N-(1-bencil-2-metilquinolinio-4-il)amino]-10-[N'-(2-metilquinolinio-4-il)amino]decano

yoduro de bis(trifluoroacetato)-3,5-dimetoxibencilo de 1-[N-(1-bencil-2-metilquinolinio-4-il)amino]-12-[N'-(2-metilquinolinio-4-il)amino]dodecano

10 bis(trifluoroacetato) de 1,10-bis[N-[1-(3,5-dimetoxibencil)-2-metilquinolinio-4-il]amino]decano

bis(trifluoroacetato) de 1-[N-[1-(3,5-dimetoxibencil)-2-metilquinolinio-4-il]amino]-10-[N'-(2-metilquinolinio-4-il)amino]decano

1,1'-(3-yodopropiliden)bis[benzeno]

bis(trifluoroacetato) de 1,10-bis[N-[1-(3,3-difenilprop-1-il)-2-metilquinolinio-4-il]amino]decano

15 yoduro de 4,7-dicloro-1-metilquinolinio

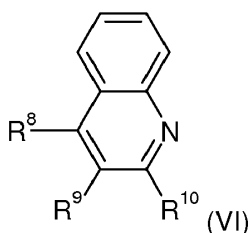
dihidrato de diyoduro de 1,10-bis[N-(7-cloro-1-metilquinolinio-4-il)amino]-decano.

El dequalinio y sus sales están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Sigma Aldrich. Los métodos para preparar análogos adecuados se describen en el documento WO 97/48705, Galanakis et al. (1995) J. Med. Chem. 38: 595-606, Galanakis et al (1995) J. Med. Chem. 38: 3536-3546 y Galanakis et al (1996) J. Med. Chem. 39: 3592-3595, Abeywickrama et al. (2006) Bioorganic Medicinal Chem. 14: 7796-7803, Qin et al. (2000) J. Med. Chem. 43: 1413-1417, Campos Rosa et al (1996) J. Med. Chem. 39: 4247-4254. En particular, la síntesis del Compuesto 7 se describe en Galanakis *et al.* (1995) *supra* y la síntesis del Compuesto 7₁₂ puede derivarse de éste.

20 Los compuestos de fórmula (IV) y (V) pueden prepararse por métodos análogos a los métodos conocidos para preparar dequalinio, como se describe y se hace referencia anteriormente.

Los compuestos de fórmula (IV) y (V) pueden prepararse por métodos análogos a los métodos conocidos para preparar dequalinio, como se describe y se hace referencia anteriormente.

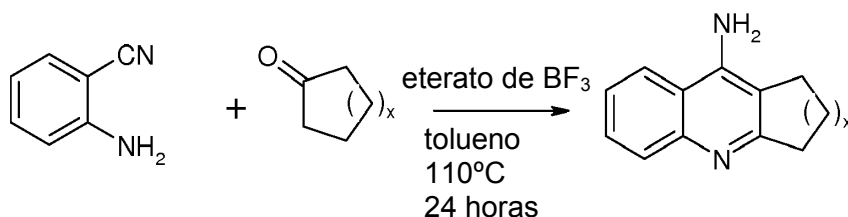
25 Por ejemplo, los compuestos de las fórmulas (IV) y (V) se pueden preparar mediante la reacción de un compuesto de quinolina de fórmula (VI):



con un compuesto de la fórmula I-(CH₂)_n-I. La reacción se lleva a cabo típicamente a una temperatura elevada, por ejemplo en el intervalo de 120°C a 160°C, por ejemplo, a aproximadamente 150°C.

30 Los compuestos de quinolina de fórmula (VI) están disponibles comercialmente o pueden elaborarse mediante métodos estándar muy conocidos por los expertos o métodos análogos a los mismos, véase, por ejemplo, Advanced Organic Chemistry de Jerry March, 4ª Edición, John Wiley & Sons, 1992, Organic Syntheses, Volumes 1-8, John Wiley, editado por Jeremiah P. Freeman (ISBN: 0-471-31192-8), 1995, Fiesers' Reagents for Organic Synthesis, Volumes 1-17, John Wiley, editado por Mary Fieser (ISBN: 0-471-58283-2), y Handbook of Heterocyclic Chemistry, A. R. Katritzky et al, 3ª Edición, Elsevier, 2010.

35 Los compuestos de fórmula (VI) en donde R⁸ es amino y R⁹ y R¹⁰ se unen para formar una cadena de alquileo (CH₂)_w pueden prepararse por medio de la siguiente secuencia de reacción:



El grupo amino puede convertirse luego en otros grupos funcionales mediante métodos estándar, por ejemplo mediante diazotización seguido de una reacción de Sandmeyer.

La secuencia de ácido nucleico puede ser una secuencia de oligonucleótidos o una secuencia de polinucleótidos. Una secuencia de oligonucleótidos se reconoce generalmente como una secuencia lineal de hasta 20 nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, mientras que una secuencia de polinucleótidos generalmente tiene más de 20 nucleótidos y puede ser de cadena sencilla o doble con cantidades variables de plegamiento interno. El esqueleto también puede modificarse para incorporar químicos sintéticos que se sabe que reducen la carga de la molécula o aumentan su estabilidad en los fluidos biológicos. Ejemplos de estos incluyen ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos unidos (LNA), oligonucleótidos de morfolino y nucleótidos de fosforotioato y sus combinaciones.

La secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de un sitio de unión celular nativo para un factor de transcripción. Dicha secuencia se conoce como un factor de transcripción señuelo (TFD). Preferiblemente, el señuelo comprende la secuencia de un sitio de unión a Sig bacteriano. Alternativamente, el señuelo comprende la secuencia de un sitio de unión de Fur bacteriano.

Se proporcionan ejemplos de secuencias de TFD adecuadas en las SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 32, 33, 39, 40, 41, 42, 43 y 44.

Los TFD son efectivos a concentraciones nanomolares y han sido efectivos para prevenir el crecimiento de bacterias *in vitro* e *in vivo* a concentraciones tan bajas como 1 nM, aunque se anticipa que contra ciertas bacterias y en entornos más complejos, como en un paciente, pueden ser necesarias concentraciones más altas. Por lo tanto, un intervalo preferido sería, por lo tanto, entre aproximadamente 10 y 100 nM, y hasta aproximadamente 1 µM. Se apreciará que el intervalo abarca concentraciones entre aproximadamente 10 nM y 1 µM, tales como 20 nM, 20 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM, 80 nM, 90 nM, 150 nM, 200 nM, 500 nM, 750 nM y sus productos intermedios, por ejemplo 27,2 nM.

Cuando el resto de suministro es un compuesto de fórmula (V) como el dequalinio o sus análogos, se forman complejos entre el ácido nucleico y el compuesto (por ejemplo, el dequalinio o sus análogos) usando diferentes proporciones de ambos. La relación se conoce comúnmente como la relación N/P (por ejemplo, véase Zhao et al. (2007) Biomacromolecules 8: 3493-3502), que define el número de átomos de nitrógeno positivos en la molécula de suministro por átomo de fosfato cargado negativamente en el ácido nucleico, o por nucleótido cuando no hay átomos de fosfato presentes. Típicamente, los complejos se forman entre el dequalinio (o sus análogos) y los TFD en relaciones N/P entre 0,1 y 1 (que es suficiente para lograr la neutralización de la carga). Se apreciará que la presente invención abarca proporciones entre 0,1 y 1, tales como 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 y sus productos intermedios, p.ej. 0,23.

Los complejos capaces de transfectar bacterias *in vitro* son muy tolerados en estudios con animales. Además, los componentes de dichos complejos pueden usarse en concentraciones por debajo de su dosis máxima tolerada conocida (MTD). La dosis máxima tolerada (MTD) es la dosis diaria más alta que no causa toxicidad manifiesta. Los estudios en animales pueden estimar la MIC como la cantidad de compuesto que, cuando se administra a un grupo de animales de ensayo, no tiene un efecto medible en la supervivencia a largo plazo. Por ejemplo, administrar un complejo que contiene 1 µM de un TFD de 100 nucleótidos con una relación N/P de 1 daría una dosis de aproximadamente 3 mg/kg de análogo de dequalinio. Se apreciará que esta dosis de análogo de dequalinio está sustancialmente por debajo de la MTD de dequalinio. Los análogos de dequalinio, tales como el Compuesto 7, muestran menos toxicidad *in vitro* que el dequalinio (Weissig et al. (2006) J. Liposome Res. 16: 249-264). Debido a que el dequalinio tiene una MTD de 15 mg/kg en ratones (Gamboa-Vujicic et al. (2006) J. Pharm. Sci. 82: 231-235) se predice que los complejos deben ser bien tolerados. Está dentro de la experiencia y el conocimiento razonables de las personas expertas el cálculo y la preparación de concentraciones adecuadas.

En un aspecto adicional, la presente invención se basa en complejos de la invención en una formulación adecuada para el tratamiento de una o más infecciones bacterianas.

En particular, se describe un método para tratar infecciones bacterianas en un sujeto que comprende administrar una secuencia de ácido nucleico formulada como se describe en este documento. El sujeto puede ser un ser humano o un animal. La invención también proporciona una secuencia de ácido nucleico formulada como se describe en el presente documento para su uso en medicina, p. ej. para su uso en el tratamiento o la prevención de infecciones bacterianas en un sujeto, y el uso de la secuencia de ácido nucleico formulada como se describe en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar infecciones bacterianas.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica o medicamento que comprende una secuencia de ácido nucleico, al menos un resto de administración como se describe en este documento anteriormente y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. La composición puede comprender adicionalmente uno o más antibióticos u otro compuesto o composición antibacteriana.

5 El número de secuencias de ácido nucleico necesarias para mostrar un efecto predecible en la expresión de un gen diana y tener un efecto bacteriostático o bactericida puede ser tan pequeño como aproximadamente 5000 moléculas por célula. Se ha encontrado que se destruyen de manera eficiente hasta 1.000.000 células bacterianas con tan solo 1 nM de TFD (documento WO/2010/038083), lo que sugiere que es suficiente tener una eficacia de transfección de menos del 0,001% para lograr la destrucción. En comparación con otras estrategias basadas en ácido nucleico para
10 combatir infecciones bacterianas, como el antisentido, esta cantidad de moléculas necesarias para matar la célula está entre 100 y 1000 veces menos. Esto refleja en parte que, aunque tanto los enfoques antisentido como los TFD actúan para inhibir los genes, los TFD actúan en las etapas iniciales para prevenir la transcripción mientras que los antisentido, en la iteración más común, bloquean estéricamente los productos de transcripción: muchos miles de moléculas de ARNm. En segundo lugar, los TFD se han diseñado para reconocer genes esenciales que se inducen positivamente, por lo que deben activarse para sobrevivir y regularse positivamente (el factor de transcripción impulsa su propia producción). *In vitro*, esta última característica significa que es probable que existan relativamente pocas copias del factor de transcripción cuando el gen no está inducido y, por lo tanto, solo un pequeño número de TFD puede bloquear la inducción.

20 Puede ser que, en una situación terapéutica, haya más factores de transcripción por célula, debido a la variedad natural entre la población bacteriana o el gen que ya está inducido. En esta situación, se espera que se necesiten más TFD para ver un efecto terapéutico y estimar que aumentar la dosis en un factor de 100 (a 100 nM) o mejorar la eficiencia de transfección (en dos órdenes de magnitud) será suficiente para ver un efecto beneficioso. La transfección se puede cuantificar utilizando microscopía de fluorescencia (Zhang et al. (1996) J. Mol. Neurosci. 7: 13-28).

25 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender como excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, o además del ingrediente activo, cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento, agente de solubilización adecuado u otros materiales conocidos por los expertos en la técnica. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son
30 conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington' Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral o por inyección, por ej. cutánea, subcutánea o intravenosa.

35 El ingrediente activo se define como una secuencia de ácido nucleico, tal como un TFD, complejo (o formulado) con un resto de administración según las reivindicaciones. En el complejo/formulación, el resto de administración, tal como el dequalinio o su análogo, está en forma de blosoma. El término 'blosoma' se usa en esta memoria descriptiva para describir las vesículas del derivado después de que el compuesto se haya sometido a sonicación (véase Weissig and Torchilin (2001) Adv. Drug Delivery Rev. 49: 127-149).

40 Se puede usar una variedad de métodos para administrar el complejo antibacteriano de la presente invención al sitio de la infección bacteriana. Los métodos para administración *in vivo* y/o *in vitro* incluyen, entre otros, administración bucal u oral, administración intravenosa, inyección directa en la infección o inyección indirecta (por ejemplo, inyección subcutánea, intraperitoneal, intramuscular u otros métodos), aplicación tópica, exposición directa en solución o medios acuosos, transfección (p. ej., mediada por fosfato de calcio, electroporación, DEAE-dextrano y lípidos), expresión transgénica (p. ej., un sistema de expresión señuelo administrado por microinyección, generación de células madre embrionarias o transferencia retroviral), o cualquiera de los otros sistemas de administración de
45 ácido nucleico comúnmente utilizados en la técnica. La administración puede ser en combinación con una dosis adecuada de antibiótico, siendo los antibióticos administrados al mismo tiempo que la secuencia de ácido nucleico, o por separado.

50 Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden estar en forma de tabletas, cápsulas, polvos o líquidos. Una tableta puede comprender un vehículo sólido tal como la gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido tal como agua, vaselina, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se pueden incluir soluciones salinas fisiológicas, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

55 Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el lugar de la afección, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable libre de pirógenos y con un pH, tonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica pueden preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato, conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, cuando sean necesarios.

Para algunas aplicaciones, la formulación farmacéutica puede no ser necesaria. Por ejemplo, el complejo antibacteriano de la invención se puede tolerar como un producto farmacéutico propio, sin necesidad de contener

excipientes y/o vehículos.

Alternativamente, el complejo antibacteriano puede ser adecuado para su uso como desinfectante antibacteriano y, por lo tanto, puede requerirse en un formato acuoso adecuado. En cuyo caso, el complejo puede comprender además disolventes acuosos y orgánicos y sus combinaciones.

- 5 El complejo antibacteriano de la invención se puede usar para tratar una variedad de infecciones bacterianas en cualquier lugar dentro del cuerpo humano. Se pueden describir cinco áreas generales para la infección bacteriana.

Las infecciones del tracto respiratorio se encuentran entre las más comunes, las infecciones del tracto respiratorio superior, incluidos los oídos, la garganta y las fosas nasales, que se pueden tratar con aplicaciones tópicas o preparaciones en aerosol. Las infecciones del tracto inferior incluyen neumonía (causada por una variedad de patógenos bacterianos, bronquitis y complicaciones infecciosas asociadas a la fibrosis quística).

10 Un problema común, tanto en la comunidad hospitalaria como en su práctica, son las infecciones del tracto urinario, en las que la orina es infectada y los agentes antibacterianos tienen que introducirse a la vejiga, la próstata, el uréter y los riñones.

15 El intestino es vulnerable a las infecciones, donde las bacterias causan enfermedades ya sea por invasión de la mucosa o por la producción de toxinas, un ejemplo de las cuales incluye epidemias de cólera y, cuando se usan antibióticos, se ingieren o se administran por vía intravenosa.

20 Las infecciones cutáneas y de los tejidos blandos, que pueden tratarse por aplicaciones tópicas, son comunes en las lesiones traumáticas o quemaduras, tal que propician la colonización y la entrada de microorganismos que dan lugar a infecciones que se localizan o se diseminan rápidamente a través de los tejidos. Los microbios responsables de las infecciones de la piel a menudo surgen de la flora normal de la piel, como el *Streptococcus pyogenes* que causa infecciones superficiales de la piel (impétigo), celulitis (infección más profunda que puede propagarse a la sangre) y fascitis necrotizante, una infección rápidamente progresiva con riesgo de vida.

Finalmente, las infecciones del sistema nervioso central, como la meningitis bacteriana, son quizás las más difíciles de tratar, ya que las terapias deben penetrar la barrera hematoencefálica, al igual que las bacterias patógenas.

25 El complejo antibacteriano de la presente invención se puede usar en combinación con uno o más antibióticos a los que la secuencia de ácido nucleico hace que la célula bacteriana sea más sensible y/o con otro agente antibacteriano. Los antibióticos adecuados se describen en las solicitudes en tramitación con la presente WO 2009/044154 y WO 2010/038083. Se apreciará que las listas provistas en las mismas pueden no ser exhaustivas. La presente invención abarca cualquier compuesto o composición antibiótica o antibacteriana adecuada.

30 El antibiótico o compuesto antibacteriano puede administrarse simultáneamente con, o antes o después del complejo antibacteriano de la invención. El compuesto antibiótico/antibacteriano y el complejo antibacteriano pueden administrarse en la misma composición o en composiciones separadas. Por lo tanto, la invención incluye terapias de combinación en las que un complejo antibacteriano identificado, y/o como se describe en este documento, se administra a un sujeto en combinación con uno o más antibióticos u otras terapias antibacterianas. La composición

35 puede comprender adicionalmente uno o más antibióticos u otros compuestos o composiciones antibacterianas. Los TFD adecuados abarcados por la invención y/o sus objetivos se enumeran a continuación. Las secuencias proporcionadas en el presente documento ilustran cadenas individuales de los sitios de unión. Sin embargo, se apreciará que en la naturaleza y en los TFD de la presente invención, las secuencias serán bicatenarias. Las cadenas complementarias a las secuencias enumeradas en el presente documento se pueden derivar clara y fácilmente, por ejemplo de Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition), 2001 de Joseph Sambrook y David Russell.

WhiB7

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

5'- CACCAGCCGA AAAGGCCACG GACCCGCGAGT CACCCGGATC
CGTGGCCATT TTTGTCGGAC CCCCCGAGAA ATCTGGTCGC
AGGATCCATC AGCTCAGACA GATCAC- 3' (SEQ ID NO: 1)

45 WhiB7 TFD:

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

FadR

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

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

Un ejemplo de una secuencia TFD FadR comprende

5' TTT ATT CCG AAC TGA TCG GAC TTG TTC AGC GTA CAC GTG TTA GCT
 ATC CTG CGT GCT TCA 3' (**SEQ ID NO: 4**)

YycG/YycF

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

YycF_LytM

5'- GCTATTTTGTAAATGACAATGTAATGAGTTTAGTAAAAA-3' (**SEQ ID NO: 5**)

YycF_SsaA

5'- ATTACAAATTTGTAACAGACTTATTTTA-3' (**SEQ ID NO: 6**)

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

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

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

Sigma 54 o Sig^B

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

- 15 SA_sig: 5'- TTATTATATA CCCATCGAAA TAATTTCTAA TCTTC-3' (**SEQ ID NO: 9**)

KP_sig: 5'- CCGATAAGGG CGCACGGTTT GCATGGTTAT-3' (**SEQ ID NO: 10**)

Fur

Las secuencias consenso para la unión de Fur en *S. aureus* y *E. coli* comprenden:

- 20 SA_fur: 5'- ACT ACA AGT ACT ATT AGT AAT AGT TAA CCC TT-3' (**SEQ ID NO: 11**). Secuencia consenso ('Fur BOX') como se describe en Horsburgh, J. Bacteriology (2001) 183:468.

EC_fur: 5'- GATAATGATAATCATTATC-3' (**SEQ ID NO: 12**). Secuencia consenso como se describe en de Lorenzo, J. Mol. Biol. (1998) 283:537.

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

HP_fur: 5'- GTT GTC CCA TAA TTA TAG CAT AAA TGA TAA TGA AAA AGT AAA-3' (**SEQ ID NO: 13**)

- 25 **TcdR**

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

5'- AAG TTT ACA AAA TTA TAT TAG AAT AAC TTT TTT A TT-3' (**SEQ ID NO: 14**). Secuencia consenso (TcdR, donde las listas -35 y -10 están subrayadas) como se describe en Dupuy, Mol. Micro. (2006) 55:1196.

Vfr

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

PA_Vfr: 5'- AAA TGT GAT CTA GAT CAC ATT T-3' (**SEQ ID NO: 15**). Secuencia consenso como se describe en Kanack, Microbiol. (2006) 55:1196.

PA_ToxA: 5'- CACTCTGCAA TCCAGTTCAT AAATCC-3' (**SEQ ID NO: 16**)

PA_RegA: 5'- GTAACAGCGGAACCACTGCACAG -3' (**SEQ ID NO: 17**)

- 35 **NtrC**

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

5'- GCTTTGCACTACCGCGGCCCATCCCTGCCCAAAACGATCGCT -3' (**SEQ ID NO: 18**)

ArsR

Los ejemplos de una secuencia de unión nativa comprenden:

HP_AmiE: 5'- ATAATCATAA TGATTAAAGT TTTCATATTC ATTATAAATC CGTTTACACA ATTATT -3' (**SEQ ID NO: 19**)

HP_RocF: 5'- GAAATTGTTC TATTTATTAT CCATTGCTT ATTAATAATT GGTTGTTAAT TTTGGTTTAG A -3' (**SEQ ID NO: 20**)

Secuencia consenso resistente a glucopéptidos (GISA)

Un ejemplo de secuencia consenso, que se encuentra en el promotor de *tcaA*, un conocido regulador positivo de la virulencia (Maki, Antimicrobial Agents Chemother. (2004) 48:1953) se puede usar en un complejo antibacteriano de la invención, por ejemplo:

SA_TcaA: 5'- TGAACACCTTCTTTTTA -3' (**SEQ ID NO: 21**)

AgrA

Ejemplos de una secuencia para motivos encontrados en genes que están regulados positivamente por Agr, un regulador asociado con la virulencia (Dunman, J. Bacteriol. (2001) 183:7341) son:

SA_Agr_2093: 5'- AGA AAG ACA AAC AGG AGT AA -3' (**SEQ ID NO: 22**)

SA_Agr_1269: 5'- GAA GAA ACA AAA AGC AGC AT -3' (**SEQ ID NO: 23**)

Secuencias de cebador adecuadas para un *S. aureus* TFD Sig son:

SAsigB FOR: GAA GAT TAG AAA TTA TTT CGA T GGG TAT ATA ATA A (**SEQ ID NO: 24**); y

SASigB REV: TAT TAT ATA CCC ATC GAA ATA ATT TCT AAT CTT C A (**SEQ ID NO: 25**).

Secuencias de cebador adecuadas para un *S. aureus* Fhu TFD son:

SAfhu FOR: ACT ACA AGT ACT ATT AGT AAT AGT TAA CCC TA (**SEQ ID NO: 26**); y

SAfhu REV: AGG GTT AAC TAT TAC TAA TAG TAC TTG TAG TA (**SEQ ID NO: 27**)

Secuencias de cebador adecuadas para un *S. aureus* SsaA TFD son:

SsaA FOR: ATT ACA AAT TTG TAA CAG ACT TAT TTT A (**SEQ ID NO: 28**); y

SsaA REV: AAA ATA AGT CTG TTA CAA ATT TGT AAT A (**SEQ ID NO: 29**)

Para formar un Sig mancuerna TFD (denominado SA3 TFD), se pueden sintetizar los siguientes oligonucleótidos fosforilados:

SigDB_SA3: CTTGG TTTT CCAAG GAA GAT TAG AAA TTA TTT CGA T GGG TAT ATA ATA (**SEQ ID NO: 30**); y

SigDB_SA3: P-CCG TCT TTT TGA CGG TAT TAT ATA CCC ATC GAA ATA ATT TCT AAT CTT C (**SEQ ID NO: 31**)

Las secuencias de los pares de oligonucleótidos utilizados para formar un WalR_TFD son:

WalR1: 5'- P-CTT GGT TTT TCC AAG TAA TGA ATG AGT TTA AAG CCC ATG TAA AAG GGG TAT CAG TAC- 3' (**SEQ ID NO: 32**); y

WalR2: 5'- P-CCC TCT TTT TGA GGG GTA CTG ATA CCC CTT TTA CAT GGG CTT TAA ACT CAT TCA TTA- 3' (**SEQ ID NO: 33**).

Otros cebadores adecuados para los TFD incluyen:

fabBf: 5'- tct tta aat ggc tga tgc gac ttg - 3' (**SEQ ID NO: 34**); y

fabBr 5'- agt aag ttg cga atg cac aat agc gta - 3' (**SEQ ID NO: 35**).

Ks54f: P-CCG ATA AGG GCG CAC GGT TTG CAT GGT TAT A (**SEQ ID NO: 36**); y

Ks54r: P-ATA ACC ATG CAA ACC GTG CGC CCT TAT CGG A (**SEQ ID NO: 37**).

Una secuencia consenso para un WalR TFD puede ser TGT WAW NNN NNT GTA AW (**SEQ ID NO: 38**) donde: W es A o T.

Una secuencia consenso para un SigB TFD puede ser GKT TWA NNN NNN NNN NNN NNK GGT AW (**SEQ ID NO: 39**) donde: K es G o T; W es A o T.

5 Un ejemplo de una secuencia TFD sig KP es TGG CAC AGA TTT CGC T (**SEQ ID NO: 40**)

Una secuencia consenso para un KP_TFD Sig puede ser TGG NNN NNN WTT TGC W (**SEQ ID NO: 41**) donde W es A o T.

Dichos TFD pueden prepararse y probarse como se describe en las solicitudes en tramitación con la presente WO 2009/044154 y WO 2009/044154.

10 La invención se describirá ahora además mediante ejemplos y figuras no limitantes, en los que:

Figura 1. Estructura química del dequalinio.

Figura 2. Estructura química de dicloruro de 10,10'-(decano-1,10-diil) bis (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridinio).

Figura 3. Estructura química de dicloruro de 10,10'-(dodecano-1,12-diil) bis (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridinio).

Figura 4. Distribución por tamaños de 100 µM de balsomas sC7 medido por dispersión dinámica de la luz.

15 **Figura 5.** Distribución por tamaños de 100 µM de balsomas sC7_12 medido por dispersión dinámica de la luz.

Figura 6. Ensayo de unión al SYBR Green-DNA para medir la unión de los balsomas del compuesto 7 a los TFD.

Figura 7. Ensayo de unión al SYBR Green-DNA para medir la unión de los balsomas del compuesto 7_12 a los TFD.

20 **Figura 8.** Ensayo de unión de SYBR Green-DNA para cuantificar la estabilidad de los complejos formados con balsomas del Compuesto 7 y Sig_TFD.

Figuras 9A & 9B. Micrografías electrónicas de complejos TFD formados con balsomas del Compuesto 7 y Sig_TFD.

Figura 10. Ensayos biológicos *In vitro* que demuestran el retraso del crecimiento de EMRSA-15 con complejos Sig formados con el Compuesto 7.

25 **Figura 11.** Ensayos biológicos *In vitro* que demuestran el retraso del crecimiento de *E. coli* con los complejos EC_Fur formados con el Compuesto 7.

Figura 12. Ensayos biológicos *In vitro* que demuestran el retraso del crecimiento de EMRSA-15 con complejos Sig formados con el Compuesto 7_12.

30 **Figura 13.** Gráficos del tiempo transcurrido frente a la densidad óptica que muestran el efecto de un complejo TFD Sig/Compuesto 7_12 en horquilla frente a un complejo codificado y un control vacío en el crecimiento de la cepa MRSA.

Figura 14. Gráficos del tiempo transcurrido frente a la densidad óptica que muestran el efecto de un complejo TFD Sig/Dequalinio en horquilla frente a un complejo codificado y un control vacío sobre el crecimiento de la cepa MRSA.

35 **Figura 15.** Gráfico que ilustra la ganancia en peso de ratones tratados con el complejo TFD SA_Sig/Compuesto 7, el complejo SA_Sig_TFD/Compuesto 7_12, o solución salina. a) y b) denotan repeticiones independientes del experimento.

Figura 16. Diagrama de barras que muestra la carga de tejido renal después de un tratamiento en ratones con el Compuesto 7_12, el complejo TFD SA_Sig/Compuesto 7_12, el complejo SA_Sig_TFD Scr/Compuesto 7_12, SA_Sig_TFD, vancomicina o vehículo.

40 **Figura 17.** Ensayos biológicos *In vitro* que demuestran el retraso del crecimiento de EMRSA-15 con Sig_TFD mezclado con gramicidina.

Figura 18. Ensayos biológicos *In vitro* que demuestran el retraso del crecimiento de EMRSA-15 con TFD Sig mezclado con Buforina II.

45 **Figura 19.** Fluorescent microscopy confirms delivery of dye-labelled oligonucleotide to MRSA by Buforin II-derivatised complexes formed with compuesto 7.

Figura 20. Ensayos biológicos *In vitro* que demuestran el retraso del crecimiento de *E. coli* con EC_TFD Fur mezclado con polimixina.

Figura 21. La microscopía por fluorescencia confirma la administración de oligonucleótido marcado con tinte a MRSA por complejos derivados de Buforina II formados con el Compuesto 7.

- 5 **Figura 22.** Ensayos biológicos *In vitro* que demuestran el retraso en el crecimiento de EMRSA-15 con los complejos TFD Sig derivados de Buforina II formados con el compuesto 7.

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1 - un sitio de unión a WhiB7 nativo en *M. smegmatis* cepa MC2 155

SEQ ID NO: 2 - señuelo del factor de transcripción de WhiB7

- 10 SEQ ID NO: 3 - un sitio de unión a FadR nativo en *E. coli* K12

SEQ ID NO: 4 - señuelo del factor de transcripción FadR

SEQ ID NO: 5 - un sitio de unión nativo para YycF/YycG en *S. aureus*

SEQ ID NO: 6 - un sitio de unión nativo para YycF/YycG en *S. aureus*

SEQ ID NO: 7 - señuelo LytM

- 15 SEQ ID NO: 8 - señuelo SsaA

SEQ ID NO: 9 - un sitio de unión nativo para Sig^B en *S. aureus*

SEQ ID NO: 10 - un sitio de unión nativo para Sig^B en *K. pneumoniae*

SEQ ID NO: 11 - una secuencia consenso para la unión de Fur en *S. aureus*

SEQ ID NO: 12 - una secuencia consenso para la unión de Fur en *E. coli*

- 20 SEQ ID NO: 13 - una secuencia de unión nativa para Fur en *H. pylori*

SEQ ID NO: 14 - un sitio de unión de consenso para TcdR en *C. difficile*

SEQ ID NO: 15 - un sitio de unión de consenso para Vfr en *P. aeruginosa*

SEQ ID NO: 16 - un sitio de unión nativo para Vfr en *P. aeruginosa*

SEQ ID NO: 17 - un sitio de unión nativo para Vfr en *P. aeruginosa*

- 25 SEQ ID NO: 18 - un sitio de unión nativo para NtrC en *K. pneumoniae*

SEQ ID NO: 19 - una secuencia de unión nativa para ArsR en *H. pylori*

SEQ ID NO: 20 - una secuencia de unión nativa para ArsR en *H. pylori*

SEQ ID NO: 21 - una secuencia consenso resistente a glicopéptidos en *S. aureus*

SEQ ID NO: 22 - un motivo de unión de Agr en *S. aureus*

- 30 SEQ ID NO: 23 - un motivo de unión de Agr en *S. aureus*

SEQ ID NO: 24 & 25 - secuencias de cebadores directos e inversos para la preparación por PCR del SA_{SigB} TFD

SEQ ID NO: 26 & 27 - secuencias de cebadores directos e inversos para la preparación por PCR del SA_{fh} TFD

SEQ ID NO: 28 & 29 - secuencias de cebadores directos e inversos para la preparación por PCR del SsaA TFD

SEQ ID NO: 30 - secuencia de oligonucleótidos Sig mancuerna TFD fosforilado

- 35 SEQ ID NO: 31 - secuencia de oligonucleótidos Sig mancuerna TFD fosforilado

SEQ ID NO: 32 - oligonucleótido fosforilado que incorpora el sitio de unión para WalR

SEQ ID NO: 33 - oligonucleótido fosforilado que incorpora el sitio de unión para WalR

SEQ ID NO: 34 & 35 - cebadores directos e inversos para el promotor FabB

SEQ ID NO: 36 & 37 - cebadores directos e inversos para TFD que contiene la secuencia de reconocimiento para el factor $\sigma 54$ de *K. pneumoniae*

SEQ ID NO: 38 - secuencia consenso de WalR TFD

SEQ ID NO: 39 - secuencia consenso de SigB TFD

5 SEQ ID NO: 40 - secuencia de KP_TFD Sig

SEQ ID NO: 41 - secuencia consenso de KP_TFD Sig

SEQ ID NO: 42 - secuencia de horquilla Gram TF sig negativa

SEQ ID NO: 43 & 44 - cebadores directos e inversos para el sitio de unión Sig codificado en *S. aureus*

10 SEQ ID NO: 45 & 46 - cebadores directos e inversos utilizados para la amplificación de una secuencia diana del vector pGEMT-Easy

SEQ ID NO: 47 & 48 - cebadores directos e inversos para WhiB7 TFD

SEQ ID NO: 49 - Secuencia de TFD de SA SIG en horquilla

SEQ ID NO: 50 - Secuencia de TFD en horquilla codificada de SA_SIG

SEQ ID NO: 51 - secuencia peptídica de Buforina II

15 SEQ ID NO: 52 - SATFD Sig derivatizado con Tef

Ejemplo 1. FORMACIÓN DE COMPLEJOS CON ANÁLOGOS DE DEQUALINIO Y TFDs

20 Weissig et al have mostraron (documento WO99/013096) que el dequalinio (DQA) se puede usar para suministrar ADN a las mitocondrias. Mediante la sonicación, DQA forma agregados de apariencia esférica con un diámetro de entre aproximadamente 70 y 700 nm, similar a las vesículas de los fosfolípidos. Estos agregados se denominaron 'DQAsomas' en el documento WO99/013096 y 'bolasomas' en Weissig y Torchilin ((2001) Adv. Drug Delivery Rev. 49: 127-149). El término 'bolasoma' se usa en esta memoria descriptiva para describir vesículas de DQA y sus análogos después de que los compuestos se sometan a sonicación.

25 Los complejos consisten en un oligonucleótido del Señuelo del Factor de Transcripción (TFD, por sus siglas en inglés) autoensamblado con un compuesto de administración adecuado. Un oligonucleótido TFD tiene una longitud de 40 a 100 nucleótidos y tiene un esqueleto de fosfato natural. Se hibrida consigo mismo para formar un sitio de unión para el factor de transcripción diana y tiene una horquilla de formación natural para proteger los extremos 5' y 3', un ejemplo del cual se muestra a continuación (GN_SIG_HP):

```
-agc-gtg-ata-ata-att-att-g-
agcg5'                               g
3'-cac-tat-tag-taa-tag-a-
```

SEQ ID NO:42

30 En una configuración alternativa, los pequeños bucles en forma de horquilla en cada extremo del TFD actúan para proteger la molécula de la degradación y dan al TFD una forma de mancuerna (DB).

Materiales y métodos.

35 **Preparación de compuestos de liberación.** Se disolvieron 15 mg de cada compuesto (Sygnature Ltd.) en 10 ml de metanol y se secaron completamente con un evaporador rotatorio y se resuspendieron en Hepes 5 mM a pH 7,4 hasta una concentración final de 10 mM. El compuesto 7 se disolvió fácilmente para dar una solución clara, de color amarillo claro. El compuesto 7_12 se disolvió después de colocarlo en un baño de ultrasonidos durante 1 h, formando una solución opaca de color amarillo claro. Ambas soluciones se sometieron a sonicación con sonda en hielo utilizando un MSE Soniprep 150. Las condiciones utilizadas fueron: 60 ciclos de 30 s en (amplitud 10 micrones) y 60 s en reposo. Después de este tratamiento, la muestra del Compuesto 7_12 se encontraba completamente clara. 40 Ambas muestras se centrifugaron para eliminar los residuos y se mencionan como sC7 (Compuesto 7 sonificado) o sC7_12 (Compuesto 7_12 tratado por ultrasonido). Este paso formó vesículas o 'bolasomas'.

Preparación de complejos TFD con mancuernas. 2 µg de TFD (un oligonucleótido de 32 bp que se ha ligado para formar un círculo monomérico) se mezcló con 1 ml de Hepes 5 mM a pH 7,4 o de caldo LB (caldo de Luria Bertani: 1% (p/v) Bacto-triptona, 5% (p/v) Extracto de Bacto-Levadura, 5% (p/v) NaCl) que luego se mezcló con entre 1 y 10 µl de sC7 o sC7_12 a temperatura ambiente.

45 **Preparación de complejos TFD en horquilla.** Los oligonucleótidos se suspendieron en agua a una concentración de 1 mM (es decir, 180 nmoles en 180 µl). La suspensión se diluyó a 10 µM en agua y se calentó a 95°C durante 2 minutos en un bloque de calentamiento seco, después de lo cual la suspensión se retiró del calor y se dejó enfriar a

temperatura ambiente. Para confirmar que el TFD se había recogido correctamente, se mezclaron 1 µl de TFD con 1 µl de tampón 10 × NEB 1, 6 µl de agua y 1 µl de exonucleasa I (NEB). Una mezcla de control excluye el 1 µl de TFD. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos antes de separarla en un gel de agarosa de Punto de fusión bajo al 3%/TAE teñido con 0,5 × SYBR Green. La conformación correcta de TFD se confirmó por la resistencia a la digestión con exonucleasas.

Para preparar los complejos de administración, se suspendieron 10 mg del compuesto en 12,5 ml de Hepes 5 mM, pH 7,5 (concentración final 0,8 mg/ml) y se disolvieron por sonicación (30 x 30 s, 30 s, en hielo a 10 µ). La absorbancia de la solución resultante se midió a 327 nm para establecer una concentración precisa. 12,5 µl del compuesto de administración se mezclaron con 40 µl de TFD 10 µM y 447,5 µl de Hepes 5 mM (pH 7,5) y se trató con ultrasonidos en un baño de hielo usando una Soniprep MSE 150 unida con una microsonda. Se realizaron treinta ciclos de sonicación con 30 s de encendido (con un 50% de potencia, aproximadamente 10 µ) y 30 s de apagado.

Ensayos de unión al ADN. Para determinar la proporción de los TFD unidos por las vesículas, se utilizó un ensayo de unión SYBR-green. Los complejos de TFD se formaron como se describió anteriormente en el tampón Hepes con la adaptación de que el tampón contenía 5 µl de una dilución 1 en 10 de tinte SYBR Green I (Invitrogen, 10.000 × solución madre preparada en DMSO). Se midió la fluorescencia (λ_{EX} 497 nm, λ_{EM} 520 nm) para determinar la cantidad de bolasoma que se debía agregar para inactivar la unión de SYBR Green a los TFD.

Determinación del tamaño. El tamaño de las bolasomas se determinó mediante la dispersión dinámica de la luz utilizando un instrumento Dynapro Titan DLS.

Visualización de las partículas. El tamaño de las partículas se midió utilizando microscopía electrónica. Las muestras se tiñeron directamente con acetato de uranilo antes de la obtención de imágenes.

Resultados.

1.1 Distribución por tamaños de los bolasomas sC7

Se prepararon bolasomas sC7 en tampón Hepes 5 mM a una concentración de 10 mM. Antes de medir su distribución de tamaño por dispersión dinámica de la luz, las bolasomas se diluyeron en el mismo tampón 1000 veces. La mayoría del material en masa tenía un diámetro superior a 3 µm y fue causado por agregados no específicos o polvo. Las partículas restantes tenían un diámetro promedio de 68 nm (Figura 4). Esto es algo diferente a la distribución de tamaño publicada de las vesículas (Weissig et al. 2001 S. T. P. Pharma Sci. 11: 91-96: Tabla I, ver Compuesto 7) que estimó que la distribución del tamaño era 169 nm +/- 50 nm y comentó que la distribución era estrecha. Los valores para bolasomas sC7 están más cerca de los valores publicados, aunque la diferencia puede reflejar diferentes parámetros experimentales e instrumentos de medición. De hecho, el hecho de que las bolasomas sC7 fueran estables a pesar de la dilución indica que tienen una mayor estabilidad respecto a las bolasomas formadas por sonicación de las soluciones de dequalinio, ya que éstas vuelven al monómero en la dilución (que tiene un diámetro inferior a 10 nm).

Los diámetros de las bolasomas sC7 y sC7_12 (véase 1.2) están tabulados en la Tabla 2:

Tabla 2. Valores calculados de las concentraciones mínimas de las bolasomas sC7 y sC7_12 necesarias para inactivar la unión de SYBR Green a una concentración fija de TFD.

Elemento	Diámetro (nm)	% Masa
bolasomas sC7		
Pico 1	68,0	100
bolasomas sC7_12		
Pico 1	48,4	27,2
Pico 2	197,7	72,8

1.2 Distribución por tamaños de las balsomas sC7_12

Se prepararon las balsomas sC7_12 en tampón Hepes 5 mM a una concentración de 10 mM. Antes de medir su distribución de tamaño por dispersión dinámica de la luz, las balsomas se diluyeron en el mismo tampón 1000 veces. Como se describe en 1.1, la señal del material grande fue descontada. Las partículas restantes tenían diámetros promedio de 48,4 nm o 197,7 nm y estaban presentes en una relación de 1:2,5 (Figura 5). Esto fue marcadamente diferente de los diámetros de las balsomas sC7. Sin embargo, las partículas tenían una mejor distribución de tamaño que la reportada por otros para aquellas formadas con concentraciones similares de dequalinio y eran comparables a las obtenidas por Weissig para balsomas formadas a partir del Compuesto 7 (Weissig et al. (2001) S. T. P. Pharma Sci. 11: 91-96).

1.3 Establecimiento de las condiciones de unión óptimas de sC7 y sC7_12 a TFD con el ensayo de unión de ADN

El colorante SYBR-Green I se une específicamente al ADN de doble cadena y, como lo hace, da una fuerte señal fluorescente. Al medir el cambio en la señal en presencia de diferentes concentraciones y tipos de balsoma, fue posible calcular la cantidad mínima de balsoma necesaria para inactivar la unión de SYBR-Green, debido a que el tinte es excluido por las balsomas. Esto se logró mediante la extrapolación de la porción lineal de una curva de titulación que representó la cantidad de balsoma agregada a la señal fluorescente. Utilizando una concentración fija de 2 µg TFD/ml, se encontró que la concentración mínima de balsoma sC7 era 6,13 µg/ml (Figura 6). A estas concentraciones, el monomérico C7 no observó extinción.

Se encontró que la concentración mínima para las balsomas sC7_12 es de 9,26 µg/ml (Figura 7).

La cantidad mínima de balsoma requerida se usó en la preparación de complejos TFD. Dicha concentración también se usó para asegurar que haya una variación tan pequeña de muestra como sea posible entre las preparaciones de balsomas. En general, se observó una variación de aproximadamente el 20% y no tuvo ningún efecto observable en la función biológica.

La estabilidad de los complejos se midió controlando la fluorescencia normalizada debida a la unión del colorante SYBR Green. Las curvas de titulación para los complejos de TFD formados con balsomas sC7 permanecieron constantes durante más de 72 h cuando se almacenaron a 4°C (Figura 8), lo que muestra que las condiciones ilustradas en este documento proporcionan una mejora sustancial en la estabilidad de los complejos formados.

1.4 Imagen de Micrografía Electrónica de Balsomas sC7 y Complejos

Los complejos de TFD formados entre la balsoma sC7 y un TFD se visualizaron mediante microscopía electrónica mediante tinción negativa con acetato de uranilo. Dos ejemplos se muestran en las Figs. 9A y 9B. Se observaron claramente partículas redondas de entre 50 y 100 nm con interiores densamente teñidos con gránulos evidentes en el interior que pueden ser cuerpos condensados de ADN.

Ejemplo 2. ADMINISTRACIÓN DE TFD EN COMPUESTO 7 BALSOMA MATA MRSA

Materiales y Métodos

Preparación de mancuernas TFD por ligadura (DB-TFD)

Se sintetizaron dos oligonucleótidos, cada uno de los cuales contenía una hebra del sitio de reconocimiento para la proteína sigma alternativa de *S. aureus*. En cada extremo de la molécula, una pequeña horquilla actuó para proteger la molécula de la degradación. Cada oligonucleótido se resuspendió en dH₂O a una concentración de 250 pmol/µl. Para formar el Sig mancuerna TFD (denominado TFD Sig), se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos fosforilados:

SEQ ID NO: 30 - SigDB1: CTT GGT TTT TCC AAG GAA GAT TAG AAA TTA TTT CGA TGG GTA TAT AAT A

SEQ ID NO: 31 - SigDB2: P-CCG TCT TTT TGA CGG TAT TAT ATA CCC ATC GAA ATA ATT TCT AAT CTT C

Cuando se hibridaron, se formó la siguiente molécula:

```

T CCAAG gaa gat tag aaa tta ttt cgat ggg tat ata ata PCCGTC T
TTT
T GGTTCPCTT CTA ATC TTT AAT AAA GCTA CCC ATA TAT TAT GGCAG T

```

Los 30 µl de cada oligonucleótido se mezclaron con 27 µl de dH₂O y se hibridaron utilizando el siguiente programa de PCR: ANNEAL: 95°C 3 min, se enfrió de -0,1°C/s a 8°C, final. Después de lo cual, se agregaron 10 µl de 10x NEB de tampón Ligasa y 3 µl de HC T4 DNA ligasa (NEB). La mezcla se incubó durante la noche a 16°C. El material

se digirió luego extensivamente con exonucleasa T7 (NEB) para eliminar cualquier oligonucleótido no ligado y luego se recuperó mediante dos rondas de precipitación con etanol. También se preparó un DB_TFD que contenía una versión codificada del sitio de enlace de Sig, denominado TFD Scr. En este caso los cebadores fosforilados utilizados fueron:

5 **SEQ ID NO: 43** - SigScr_SA1: CTT GGT TTT TCC AAG TAG AAA GAA GAT TTA GGG CGA T TTT ATA ATA TAT

SEQ ID NO: 44 - SigScr_SA2: CCG TCT TTT TGA CGG ATA TAT TAT AAA ATC GCC CTA AAT CTT CTT TCT A

Formación de Complejos

La cantidad mínima de bolasoma sC7 necesaria para unirse a 2 µg de cualquiera de los TFD se estableció empíricamente y la cantidad apropiada de bolasomas se mezcló con los TFD en Hepes 5 mM, pH 7,4, para formar
10 complejos. Las diluciones de la nanopartícula TFD se usaron en bioensayos posteriores.

Realización de estudios de crecimiento en placas de 96 pocillos

Se realizó un ensayo de crecimiento utilizando complejos que consistían en TFD Sig o TFD Scr mezclado con bolasomas sC7, para determinar el efecto sobre el crecimiento de una cepa de MRSA clínicamente aislada. Los
15 ensayos para determinar el efecto sobre el crecimiento de células bacterianas se realizaron utilizando placas de 96 pocillos, cada pocillo contenía 200 µl de caldo que consistía en medio LB. Se añadió 1 µl de diversas concentraciones de complejos de TFD a cada pocillo y se monitorizó el efecto sobre el crecimiento bacteriano de *S. aureus* midiendo la absorbancia del caldo a intervalos durante la incubación. Las placas se incubaron a 37°C con agitación y se tomaron lecturas de absorbancia (a 450 nm) utilizando un lector de placas.

Resultados

2.1 Los complejos de TFD pueden matar de manera eficiente el MRSA in vitro

Los complejos de TFD se prepararon con bolasomas sC7 utilizando un TFD que se sabe que destruye las células MRSA llamadas 'TFD Sig' o una versión codificada como control, 'TFD Scr'. La cepa MRSA, EMRSA15, se usó para
25 inocular el caldo LB para proporcionar una concentración final de células de 5×10^5 /ml. Se dispensaron alícuotas de 200 µl en pocillos en una placa de 96 pocillos. Los pocillos se complementaron con concentraciones variables del complejo TFD Sig, complejo TFD Scr, no se trataron concentraciones equivalentes de bolasomas sC7 como control para cualquier efecto antibacteriano del análogo de dequalinio (control sC7) o los pocillos (Figura 10). Ambos complejos de TFD contenían sC7 a una concentración de 500 ng/ml y TFD a 5 µg/ml. El control sC7 consistió en bolasomas a una concentración de 500 ng/ml.

El crecimiento celular fue esencialmente similar para la muestra no tratada, el control sC7 y el Complejo de Control (que consiste en el TFD Scr). Sin embargo, el complejo TFD Sig previno el crecimiento bacteriano. Por lo tanto, la
30 combinación de la bolasoma sC7 con el TFD Sig mató a la cepa MRSA, mientras que el complejo de control TFD no lo hizo. Esto se debió a los complejos que suministraban efectivamente el agente terapéutico TFD al MRSA. La acción de la administración sola, con el daño concomitante de la membrana, no mató a las bacterias ya que ni el Complejo de Control ni una cantidad equivalente de bolasomas de sC7 afectaron el crecimiento celular.

Ejemplo 3. SUMINISTRO DE TFD POR EL COMPUESTO 7 BOLASOMA MATA A *E. coli*

Materiales y Métodos

Preparación de TFD Fur por PCR

Los TFD Fur se diseñaron para incorporar el sitio de unión para el regulador transcripcional de las enzimas de síntesis de ácidos grasos, FadR, que se produce corriente arriba del gen FabB en *Escherichia coli*. El gen FabB
40 codifica una enzima involucrada en la síntesis de ácidos grasos (J. Bacteriology (2005) 183:5292). Los oligonucleótidos utilizados para amplificar la secuencia del promotor fueron:

SEQ ID NO: 34 - fabBf 5'- tct tta aat ggc tga tgc gac ttg - 3'

SEQ ID NO: 35 - fabBr 5'- agt aag ttt cga atg cac aat agc gta - 3'

El fragmento resultante se ligó en el vector pGEMTEasy (Promega) y los TFD de PCR se sintetizaron mediante
45 amplificación por PCR utilizando cebadores de oligonucleótidos diseñados para hibridar con la estructura del vector que flanquea el inserto, por ejemplo:

SEQ ID NO: 45 Tef: 5' - ggc cgc cat ggc ggc cgc ggg aat tc - 3'

SEQ ID NO: 46 TEr: 5' - agg cgg ccg cga att cac tag tg -3'.

El producto de la PCR se precipitó con etanol y se resuspendió en tampón TE (Tris 10 mM). HCl, EDTA 1 mM pH
50 8,0) a una concentración de 500-1000 ng/µl.

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

SEQ ID NO: 47 - WhiB7.f CAC CAG CCG AAA AGG CCA CGG

5 **SEQ ID NO: 48** - WhiB7.r CAA AAA TGG CCA CGG ATC CGG GTG

Resultados

3.1 Los complejos de TFD pueden matar eficientemente a *E. coli* in vitro

10 Los complejos de TFD se formaron con un TFD que se sabe que es activo contra *E. coli*, EC Fur y un TFD de control, EC FurTFD Scr. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 2.1 y se obtuvieron resultados similares (Figura 11). Nuevamente, los resultados muestran que los complejos formados con bolasomas sC7 y EC TFD Fur impidieron el crecimiento de *E. coli* (cepa DH10B) en un medio limitado en hierro.

Ejemplo 4. ADMINISTRACIÓN DE TFD POR EL COMPUESTO 7_12 BOLASOMA MATA A MRSA

Materiales y Métodos

15 Los complejos de TFD se formaron como se describe en el Ejemplo 2 con Sig_TFD o TFD Scr, con la excepción de que se usaron bolasomas sC7_12. Los complejos de TFD resultantes se probaron para determinar su actividad en la prevención del crecimiento de la cepa EMRSA15 de MRSA.

Resultados

4.1 Los complejos de TFD pueden matar de manera eficiente el MRSA in vitro

20 Los complejos de TFD se prepararon utilizando un TFD que se sabe que destruye las células de MRSA llamado 'TFD Sig' y una versión codificada, 'TFD Scr', como un control con bolasomas sC7_12. La cepa MRSA, EMRSA15, se usó para inocular el caldo LB para dar una concentración final de células de 5×10^5 /ml. Se dispensaron alícuotas de 200 µl en pocillos en una placa de 96 pocillos. Los pocillos se complementaron con concentraciones variables de complejos TFD Sig, complejos ScrFD Scr, concentraciones equivalentes de bolasomas sC7_12 como control para cualquier efecto antibacteriano del análogo de dequalinio (control sC7_12) o los pocillos no se trataron (Figura 12).
25 Ambos complejos de TFD contenían sC7_12 a una concentración de 800 ng/ml (1,3 µM) y TFD a 5 µg/ml (153 nM). El control sC7_12 consistió en bolasomas a una concentración de 800 ng/ml.

30 El crecimiento celular fue esencialmente similar para la muestra no tratada, el control sC7_12 y el complejo de control (incluido el TFD Scr). Sin embargo, el complejo TFD Sig previno el crecimiento bacteriano. Por lo tanto, la combinación de la bolasoma sC7_12 con el TFD Sig mató a la cepa MRSA, mientras que el complejo de control TFD no lo hizo. Esto se debió a los complejos que suministraban efectivamente el agente terapéutico TFD al MRSA. La acción de la administración individual, con el daño concomitante de la membrana, no destruyó las células, ya que ni el complejo de control ni una cantidad equivalente de bolasomas sC7_12 afectaron al crecimiento celular.

Ejemplo 5. ADMINISTRACIÓN DE TFD EN HORQUILLA POR VARIOS COMPUESTOS DE SUMINISTRO MATA MRSA

35 Los complejos de TFD que contienen TFD SA SIG en horquilla y el dequalinio, el Compuesto 7 o el Compuesto 7_12 se prepararon utilizando el método expuesto en el Ejemplo 1. Las distribuciones de tamaño de las vesículas formadas se midieron utilizando un Nanosizer Malvern utilizando una metodología estándar y se muestran en la Tabla 3 a continuación:

Tabla 3.

Compuesto de administración	Distribución del tamaño de vesícula (nm)	Concentración (µM)
dequalinio	75-820	745
compuesto 7	139 +/- 35	75
compuesto 7_12	117 +/- 32	75

40 Se encontró que la distribución de tamaño de las vesículas no se altera cuando se usaron TFD de diferentes secuencias. La secuencia de SA SIG HP (dirigida a unirse al factor sigma alternativo en *Staphylococcus aureus*) es:

SEQ ID NO: 49 - 5'-gcg aag cga aga tta gaa att att tcc atg ggt ata taa tac ttg gtt ttt cca agt att ata tac cca tgg aaa taa ttt cta atc ttc-3'

5.1. Eficacia de SA_SIG_HP TFD complejo con el compuesto 7_12

El complejo TFD se preparó como se describe en el Ejemplo 1 (conocido como Sig), ya que eran dos trampas de control, una que no contenía TFD (Vacío) y la otra una versión codificada de SA SIG HP (codificado) que contenía el TFD SA_SIG_Scr_HP, que tiene la siguiente secuencia:

SEQ ID NO: 50 - 5'-gcg aag cat ctt gta tgc aaa tag aat gaa taa tag ttt gac ttg gtt ttt cca agt caa act att att cat tct att tgc ata caa gat-3'

Se añadió 1 µl de cada complejo de administración a 200 µl de caldo LB inoculado con 1 µl de una solución madre de glicerol de una cepa de MRSA, EMSRA15, a una concentración de 3×10^6 unidades formadoras de colonias por µl. Los cultivos se cultivaron a 37°C con agitación suave y la densidad óptica de los cultivos se midió en un lector de placas a intervalos de media hora.

Los gráficos de tiempo transcurridos contra la densidad óptica mostrados en la FIG. 13 demuestran que el complejo Sig previno efectivamente el crecimiento de la cepa MRSA con concentraciones de 500 ng/ml del Compuesto 7_12 y 20 pmol de TFD. Las bacterias tratadas con el complejo Scr (con concentraciones similares de Compuesto 7_12 y TFD) crecieron más lentamente que el control Vacío y la muestra no tratada. Esto se ha observado en experimentos anteriores y se interpreta que se debe a que el crecimiento se ve frenado por la acción de suministrar el TFD revuelto en la célula. Cuando ese TFD inhibe la respuesta al estrés, al igual que SA_SIG_HP, las células no se recuperan. El crecimiento del control de vacío y la muestra no tratada fueron indistinguibles.

Por lo tanto, los complejos que contienen el TFD SIG_SA_HP, diseñado para bloquear vías esenciales en *S. aureus*, son fatales para las células bacterianas, mientras que la administración de una versión codificada del TFD o el vehículo de administración solo es ineficaz.

5.2. Eficacia de SA_SIG_HP complejada con dequalinio

El complejo TFD se preparó como se describe en la sección 5.1 anterior, con la excepción de que la concentración de dequalinio utilizada fue 6 veces mayor que la concentración del compuesto 7_12. De forma similar, se prepararon dos trampas de control, una que no contenía TFD (vacía) y la otra una versión codificada de SA SIG HP (codificada) que contenía la TFD SA_SIG_Scr_HP.

Se añadió 1 µl de cada complejo de administración a 200 µl de caldo LB inoculado con 1 µl de una solución madre de glicerol de una cepa de MRSA, EMSRA15 a una concentración de 3×10^6 unidades formadoras de colonias por µl. Los cultivos se cultivaron a 37°C con agitación suave y la densidad óptica de los cultivos se midió en un lector de placas a intervalos de media hora. Los gráficos del tiempo transcurrido frente a la densidad óptica mostrados en la FIG. 14 demuestran que el agente antibacteriano Sig previno eficazmente el crecimiento de la cepa MRSA a concentraciones de 3 µg/ml del compuesto 7_12 y 10 pmol de TFD. Las bacterias tratadas con el agente antibacteriano Scr (a concentraciones similares de dequalinio y TFD) crecieron más lentamente que el control vacío y la muestra no tratada. Esto se ha observado en experimentos anteriores y se interpreta que se debe a que el crecimiento se ve frenado por la acción de suministrar el TFD revuelto en la célula. Cuando ese TFD inhibe la respuesta al estrés, al igual que SA_SIG_HP, las células no se recuperan. El crecimiento del control de vacío y la muestra no tratada fueron indistinguibles.

Por lo tanto, los complejos que contienen el TFD SIG_SA_HP, diseñado para bloquear las vías esenciales en *S. aureus*, son fatales para las células, mientras que la administración de una versión codificada del TFD o el vehículo de administración solo es ineficaz.

Ejemplo 6. EFICACIA DE TFD SA SIG POR EL COMPUESTO C7_12 EN EL TRATAMIENTO DEL MRSA EN UN MODELO DE SEPSIS EN RATONES

Los ratones utilizados en este estudio, ratones macho CD1, fueron proporcionados por Charles River (Margate UK) y estaban libres de patógenos específicos (16-18 g en el momento del parto). Todos los ratones pesaban 22-25 g al comienzo del experimento.

6.1. Estudio de tolerabilidad

Los animales se trataron en grupos de dos ratones por grupo de tratamiento, por lo tanto, se utilizaron seis animales en total para el estudio. Todos los ratones se pesaron el día 1 del estudio y se colocaron al azar en cajas. Los ratones recibieron los siguientes tratamientos administrados por vía intravenosa a 10 ml/kg:

- TFD SA Sig 100 µM (2 mg/ml; **SEQ ID NO:9**) y el compuesto 7 a 525 µM (0,315 mg/ml) en solución salina;
- TFD SA Sig 100 µM (2 mg/ml; **SEQ ID NO:9**) y el compuesto 7_12 a 525 µM (0,315 mg/ml) en solución

salina; y

- solución salina sola.

Las concentraciones de TFD y las moléculas de administración se eligieron para que fueran aproximadamente diez veces mayores que la dosis efectiva predicha.

- 5 Los ratones se pesaron diariamente después del tratamiento durante un período de 100 h antes de ser sacrificados. Los pulmones, el hígado, el bazo y los riñones se extrajeron y se examinaron visualmente y se pesaron. La Figura 15 muestra el aumento de peso de los tres grupos con los índices a) y b) que se refieren a repeticiones experimentales independientes.

- 10 No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de control (solución salina) y los tratados con combinaciones de TFD y los compuestos de administración. Por lo tanto, todos los tratamientos fueron bien tolerados después de la administración intravenosa. No hubo eventos agudos que informar. Después del tratamiento, los ratones se alimentaron y bebieron normalmente sin signos de angustia. El aumento de peso de los ratones tratados fue el mismo que los controles con vehículo. La autopsia no mostró anomalías graves en los riñones, pulmones, hígado o tracto GI. Los pesos de los riñones, los pulmones y el hígado estaban dentro del intervalo normal. Todos los compuestos de ensayo son tolerados y adecuados para otras dosis hasta la dosis máxima utilizada en este estudio de tolerabilidad.

6.2. Estudio de la carga en tejido

- 20 Los animales se trataron en grupos de ratones por grupo de tratamiento, por lo tanto, se utilizaron cuarenta y ocho animales en total para el estudio. Se prepararon dos cultivos de 10 ml de EMRSA 16 de *Staphylococcus aureus* se colocaron en un agitador orbital (220 rpm) durante la noche a 37°C. Al día siguiente, los cultivos de EMRSA 16 *Staphylococcus aureus* se retiraron del agitador, se sedimentaron y se lavaron dos veces antes de resuspenderlos en solución salina a una DO de 0,132 ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml). Esta solución madre de EMRSA 16 de *Staphylococcus aureus* se diluyó luego 1:1,5 en solución salina (1×10^8 cfu/ml) es decir $2,0 \times 10^7$ bacterias por ratón.

- 25 Los cuarenta y ocho ratones se infectaron luego con 0,2 ml de la suspensión de $1,0 \times 10^8$ /ml mediante inyección intravenosa en la vena de la cola del ratón. El número de bacterias *Staphylococcus aureus* EMRSA 16 por ml en el resto de las suspensiones después de la inoculación también se contó para confirmar la carga de infección.

Los ratones se trataron 1, 9 y 17 horas después de la infección con compuesto o vehículo, aunque la vancomicina solo se administró después de 1h. Los tratamientos fueron una combinación de complejos de antibióticos, preparados con el Compuesto 7_12 y varios TFD, como se detalla en la Tabla 3 a continuación.

30 **Tabla 3.**

Tratamiento	Compuesto C7_12	TFD SA Sig	TFD SA Scr Sig	Vancomicina
C7_12 solo	15 ng/kg	-	-	-
complejo Sig	15 ng/kg	1 nM	-	-
complejo Scr	15 ng/kg	-	1 nM	-
TFD Sig	-	1 nM	-	-
Vancomicina	-	-	-	25 mg/kg
Solución salina	-	-	-	-

- 35 Después de 25 horas después de la infección, todos los animales se pesaron y luego se sacrificaron. Los riñones se extrajeron inmediatamente y se homogeneizaron en solución salina tamponada con fosfato estéril enfriada con hielo + 0,05% Tween 80. Los homogenizados de órganos se cultivaron cuantitativamente en agar CLED y se incubaron a 37°C hasta durante 3 días y se contaron las colonias. Los datos de las cargas en cultivo se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis utilizando Stats Direct.

6.3. Estudio de la carga en tejido

La dosis infecciosa administrada se ajustó a $3,7 \times 10^7$ bacterias por ratón para garantizar que se establecía una infección relativamente aguda, es decir, una infección que era sensible al tratamiento. Los ratones se trataron con inyección sistémica de (A) solo el compuesto de administración (compuesto C7_12), (B) 1 nM de complejo SA_Sig/compuesto 7_12, (C) 1 nM de complejo de control codificado, (D) 1 nM de TFD SA_Sig sola, (E) vancomicina, usada a una concentración suficiente para lograr una reducción de 2 veces en las unidades formadoras de colonias (cfu) o (F) vehículo. Después del tratamiento, se sacrificaron los ratones y se midió la carga encontrada dentro de los riñones (véase la Figura 16).

El análisis estadístico de los resultados mostró que los ratones tratados con el agente antibacteriano Sig snare lograron una reducción similar en la carga a la lograda por la vancomicina. Todos los demás controles muestran cargas similares frente al tratamiento con vehículo (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis estadístico de los resultados *in vivo*. Kruskal-Wallis: todas las comparaciones por pares (Dwass-Steel-Christlow-Fligner) para el complejo TFD Sig

Tratamiento	complejo Sig	complejo Scr	TFD Sig	Vancomicina	Vehículo
C7_12	0,0001	0,5490	0,4695	0,0004	0,4109
Sig snare		0,0008	<0,0001	0,7263	<0,0001
Scr snare			0,1894	0,0023	0,1588
TFD Sig				<0,0001	0,9203
Vancomicina					<0,0001

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

Ejemplo de referencia. Administración de los tfd mediada por péptidos antibacterianos

Materiales y Métodos

Se ensayaron los siguientes péptidos antibacterianos para determinar su capacidad para administrar TFD a células bacterianas: gramicidina, nonapéptido de polimixina (ambos adquiridos en Sigma Aldrich) y Buforina II (Park et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 8245-8250). Típicamente, 1 µg de DB-TFD Sig y DB-TFD SigScr, como se describe en el Ejemplo 1, se mezclaron con entre 0,2 y 5 µg de gramicidina en un volumen total de 5 µl de NaCl 50 mM. De esto, se agregó 1 µl a 200 µl de caldo LB inoculado con una dilución 1/100 de una solución madre de glicerol de EMRSA-15 a una densidad original de 0,3 OD (absorbancia a 600 nm) y se dividieron en partes alícuotas en un pocillo de una placa de 96 pocillos. Los experimentos se realizaron por triplicado. Las placas se incubaron a 37°C con agitación y se tomaron lecturas de absorbancia (a 450 nm) utilizando un lector de placas.

Resultados

7.1. La gramicidina produce eficazmente TFD en *S. aureus*

La adición de 1 µg de DB-TFD Sig a los medios LB inoculados con EMRSA-15 y con 150 ng/ul de gramicidina no produjo ningún crecimiento bacteriano. Por el contrario, el TFD solo, la gramicidina sola o la gramicidina mezclada con la versión codificada del DB-TFD crecieron, así como el control sin tratar (Figura 17).

7.2. Buforina II administra eficazmente TFD a *S. aureus*

El péptido Buforina II de 21 aminoácidos consistió en la siguiente secuencia: TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK (**SEQ ID NO:51**). Los TFD de Sig mezclados con Buforina II retrasaron el crecimiento de EMRSA-15 cuando se mezclaron con el péptido antimicrobiano activo en la membrana Buforina II e impidieron el crecimiento de las bacterias en un ensayo *in vitro* en una placa de 96 pocillos. El control TFD, Scr, que era una versión codificada de la secuencia en el TFD Sig, no tuvo ningún efecto perceptible en el crecimiento cuando se comparó con el caldo no tratado o las células tratadas con péptido solo (Figura 18).

Como alternativa, se usó un oligonucleótido marcado con fluorescencia como un sustituto para el TFD. Aunque esto no tiene una actividad predicha como una molécula de TFD, el oligonucleótido marcado con fluoresceína incorpora

un marcador fluorescente, por lo que su captación se puede monitorear mediante microscopía de luz fluorescente (Figura 19).

7.3. La polimixina aporta eficazmente TFD a *E. coli*

Cuando se mezcla con la polimixina glucopeptídica cíclica antimicrobiana activa Gram-negativa, EC TFD Fur retrasó el crecimiento de DH5a e impidió el crecimiento de las bacterias en un ensayo *in vitro* en una placa de 96 pocillos usando medios limitantes de hierro. El control TFD, TFD WhiB7, que era una secuencia no relacionada de tamaño similar al TFD Fur, no tuvo ningún efecto perceptible en el crecimiento cuando se comparó con el caldo no tratado o las células tratadas con péptido solo (Figura 20).

Ejemplo de referencia. ADMINISTRACIÓN DE COMPLEJOS DE CONJUGADOS DE TFD/DEQUALINIO CON BUFORINA II

Materiales y Métodos

Derivatización de complejos con péptido antimicrobiano

Los complejos de TFD se derivaron con el péptido antimicrobiano Buforina II usando el EDC reticulante clorhidrato de (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida; Thermo Scientific) y siguiendo una adaptación del protocolo de acoplamiento de dos pasos como lo describe el fabricante.

El péptido Buforina II se sintetizó y se liofilizó y se resuspendió a una concentración de 1 mg/ml en tampón de activación (MES 0,1 M [ácido 2-(N-morfolino)etano sulfónico], NaCl 0,5 M, pH 6,0). 1 ml de esta solución se mezcló con 0,4 mg de EDC y 1,1 mg de Sulfo-NHS (Thermo Scientific) y se incubó entre 5 y 120 minutos a temperatura ambiente, lo más típicamente 30 minutos. Después de la incubación, se agregaron 1,4 µl de 2-mercaptoetanol para inactivar el EDC. El EDC no incorporado y el Sulfo-NHS se eliminaron de la muestra de péptidos mediante diálisis utilizando tubos con un corte de bajo peso molecular (Pierce, Slide-A-Lyzer, 2K MWCO).

Los complejos de TFD concentrados se prepararon utilizando las técnicas descritas en los Ejemplos 2 y 3. Se mezclaron 35 µl de TFD a una concentración de 1,5 mg/ml con 130 µl de PBS (solución salina tamponada con fosfato; tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,2, NaCl 0,15 M) y 35 µl del Compuesto 7 sonificado (bolasomas) a una concentración de 3,15 mg/ml. Típicamente, 90 µl de complejos de TFD concentrados se mezclaron con 10 µl de Buforina II derivatizada y se dejaron reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de hidroxilamina 10 mM. Antes de su uso en bioensayos, las nanopartículas TFD derivatizadas se diluyeron a la concentración apropiada.

Como alternativa, se usó un oligonucleótido marcado con fluoresceína como sustituto del TFD. Aunque esto no tiene la actividad predicha como una molécula de TFD, el oligonucleótido marcado con fluoresceína incorpora un marcador fluorescente para que su captación pueda controlarse mediante microscopía de luz fluorescente.

Resultados

8.1. Los complejos TFD derivados de Buforina II liberan oligonucleótidos de manera efectiva en *S. aureus*

Los complejos de TFD derivados se formaron como se describe, con la excepción de que el TFD se sustituyó con un oligonucleótido marcado con fluorescencia, Tef, que contenía un colorante de fluoresceína en el extremo 5'. La secuencia del oligonucleótido fue:

SEQ ID NO:52 - Tef- Fluoresceína-AGG CGG CCG CGA ATT CAC TAG TGA.

Los complejos derivados se agregan a 200 µl de caldo LB inoculado con la cepa MRSA, EMRSA-15, y se cultivan durante la noche con agitación a 37°C. A la mañana siguiente, las células se recogieron por centrifugación y se lavaron cuatro veces en un volumen igual de PBS. Se colocó una gota de la suspensión bacteriana en un portaobjetos de microscopio y se secó al aire. Las células luego se fijaron por calor pasando el portaobjetos a través de una llama Bunsen. Luego, el portaobjetos se inundó con una solución de azul de metileno de Loeffler (5 mg/ml de azul de metileno en 69:30:1 (v/v) de agua: metanol: 1% (p/v) KOH) y se dejó reposar 1 minuto, después de lo cual el exceso de solución se lavó con agua y las células se visualizaron utilizando un Microscopio de Fluorescencia CCD Cairn.

En la imagen de campo brillante (sin fluorescencia), las bacterias se podían ver claramente agrupadas (Figura 21) y en la imagen con fluorescencia se podía ver que el oligonucleótido marcado había sido internalizado, en consonancia con la nanopartícula derivada que afectaba la administración. Las bacterias cultivadas en caldo sin complejos derivados no mostraron fluorescencia.

8.2. Los complejos de TFD derivados de Buforina II pueden prevenir el crecimiento bacteriano del MRSA

Se produjeron complejos derivados que contenían TFD Sig o TFD Scr como control (como en el Ejemplo 2). La concentración del componente TFD en la solución madre de complejos derivados fue de 8 μM y los complejos se diluyeron para dar una concentración de trabajo de TFD 16 nM y Compuesto 7 1,8 μM .

- 5 A esta concentración, los complejos derivados que contenían el TFD de Sig evitaron por completo el crecimiento de la cepa MRSA, mientras que el complejo derivado que contenía el TFD de control no lo hizo. De hecho, el crecimiento fue similar al de la muestra no tratada y al caldo de control sC7 que contenía los bolusomas del Compuesto 7 1,8 μM (Figura 22).

- 10 Por lo tanto, los complejos derivados con Buforina II suministran TFD Sig a bacterias patógenas para prevenir el crecimiento. Además, la concentración efectiva de los complejos utilizados fue inferior a la de los complejos no derivados (sección 4.1).

Ejemplo 7**Formación de complejos con otros análogos de dequalinio**

- 15 Siguiendo los métodos sintéticos generales descritos en este documento, se prepararon los siguientes análogos de dequalinio:

diyoduro de 10,10'-(octano-1,8-diil) bis (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridinio);

diyoduro de 10,10'-(dodecano-1,12-diil) bis (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridinio);

diyoduro de 10,10'-(tetradecano-1,14-diil) bis (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridinio);

diyoduro de 10,10'-(octadecano-1,18-diil) bis(9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridinio);

- 20 diyoduro de 5,5'-(dodecano-1,12-diil) bis(11-amino-7,8,9,10-tetrahidro-6H-ciclohepta[b]quinolinio);

diyoduro de 1,1'-(decano-1,10-diil) bis (4-aminoquinolinio);

diyoduro de 1,1'-(dodecano-1,12-diil) bis (4-aminoquinolinio);

diyoduro de 1,1'-(decano-1,10-diil) bis (4-metoxiquinolinio); y

diyoduro de 1,1'-(decano-1,10-diil) bis (2-aminoquinolinio).

- 25 Los compuestos enumerados anteriormente se pueden usar en los métodos descritos en los Ejemplos 1 a 7 para preparar complejos adicionales de acuerdo con la invención

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Procarta Biosystems Limited

<120> Complejos de Ácido Nucleico

- 30 <130> PBL-P003WO

<150> GB 1002413.1

<151> 2010-02-12

<150> US 61/304.087

<151> 2010-02-12

- 35 <160> 52

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 106

<212> ADN

- 40 <213> Mycobacterium smegmatis

<400> 1

caccagccga aaaggccacg gaccgcgagt caccgggatc cgtggccatt tttgtcggac 60

cccccgagaa atctgggtcgc aggatccatc agctcagaca gatcac 106

ES 2 719 234 T3

<210> 2
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Mycobacterium smegmatis

5 <400> 2
 tggccacgga tccgggtgac tgcgggtccg tggcct 36
 <210> 3
 <211> 63
 <212> ADN
 10 <213> Escherichia coli

<400> 3
 agtaagtttc gaatgcacaa tagcgtacac ttgtacgccg aacaagtccg atcagccatt 60
 taa 63
 <210> 4
 <211> 60
 15 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 4
 ttattccga actgatcgga ctgttcagc gtacacgtgt tagctatcct gcgtgcttca 60
 <210> 5
 20 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 5
 gctattttgt aatgacaatg taatgagttt agtaaaaa 38
 25 <210> 6
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 6
 30 attacaaatt tgtaacagac ttatttta 28
 <210> 7
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus

35 <400> 7
 gctattttgt aatgacaatg taatgagttt agtaaaaa 38
 <210> 8
 <211> 28
 <212> ADN
 40 <213> Staphylococcus aureus

<400> 8
 attacaaatt tgtaacagac ttatttta 28
 <210> 9
 <211> 35
 45 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 9
 ttattatata cccatcgaaa taatttctaa tcttc 35
 <210> 10
 50 <211> 30
 <212> ADN

	<213> Klebsiella pneumoniae	
	<400> 10	
	ccgataaggg cgcacgggtt gcatggtat	30
5	<210> 11	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Staphylococcus aureus	
	<400> 11	
	actacaagta ctattagtaa tagttaaccc tt	32
10	<210> 12	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Escherichia coli	
	<400> 12	
15	gataatgata atcattatc	19
	<210> 13	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Helicobacter pylori	
20	<400> 13	
	gttgtccat aattatagca taaatgataa tgaaaaagta aa	42
	<210> 14	
	<211> 36	
	<212> ADN	
25	<213> Clostridium difficile	
	<400> 14	
	aagtttaca aattatatta gaataacttt ttatt	36
	<210> 15	
	<211> 22	
30	<212> ADN	
	<213> Pseudomonas aeruginosa	
	<400> 15	
	aaatgtgatc tagatcacat tt	22
	<210> 16	
35	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Pseudomonas aeruginosa	
	<400> 16	
	cactctgcaa tccagttcat aaatcc	26
40	<210> 17	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Pseudomonas aeruginosa	
	<400> 17	
45	gtaacagcgg aaccactgca cag	23
	<210> 18	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Klebsiella pneumoniae	
50	<400> 18	
	gcttgcact accgcggccc atccctgccc caaaacgatc get	43

ES 2 719 234 T3

<210> 19
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Helicobacter pylori
 5 <400> 19
 ataatacataa tgattaaagt tttcatattc attataaatc cgtttacaca attatt 56
 <210> 20
 <211> 61
 <212> ADN
 10 <213> Helicobacter pylori
 <400> 20
 gaaattgttc tattttattat ccatttgctt attaataatt ggttgttaatt tttggtttag 60
 a 61
 <210> 21
 <211> 17
 15 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus
 <400> 21
 tgaacacctt ctttta 17
 <210> 22
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus
 <400> 22
 agaaagacaa acaggagtaa 20
 25 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus
 <400> 23
 30 gaagaaacaa aaagcagcat 20
 <210> 24
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus
 35 <400> 24
 gaagattaga aattattcg atgggtatat aataa 35
 <210> 25
 <211> 35
 <212> ADN
 40 <213> Staphylococcus aureus
 <400> 25
 tattatatac ccatcgaaat aatttctaatt ctca 35
 <210> 26
 <211> 32
 45 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus
 <400> 26
 actacaagta ctattagtaa tagttaaccc ta 32
 <210> 27
 50 <211> 32
 <212> ADN

<213> Staphylococcus aureus
 <400> 27
 agggttaact attactaata gtactttag ta 32
 <210> 28
 5 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus
 <400> 28
 attacaaatt tgtaacagac ttatttta 28
 10 <210> 29
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus
 <400> 29
 15 aaaataagtc tgttacaat ttgtaata 28
 <210> 30
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus
 20 <400> 30
 ctgggtttt ccaaggaaga ttagaaatta ttctgatggg tatataata 49
 <210> 31
 <211> 49
 <212> ADN
 25 <213> Staphylococcus aureus
 <400> 31
 ccgtctttt gacggtatta tatacccatc gaaataatt ctaatcttc 49
 <210> 32
 <211> 57
 30 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus
 <400> 32
 ctgggtttt ccaagtaatg aatgagtta aagcccatgt aaaaggggta tcagtac 57
 <210> 33
 35 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus
 <400> 33
 ccctctttt gaggggtact gataccctt ttacatgggc tttaaactca ttcatta 57
 40 <210> 34
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus
 <400> 34
 45 tctttaaag gctgatcgga ctg 24
 <210> 35
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus
 50 <400> 35
 agtaagtgc gaatgcacaa tagcgta 27

<210> 36
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Klebsiella pneumoniae
 5 <400> 36
 ccgataaggg cgcacgggtt gcatggtat a 31
 <210> 37
 <211> 31
 <212> ADN
 10 <213> Klebsiella pneumoniae
 <400> 37
 ataaccatgc aaaccgtgcg ccctatcgg a 31
 <210> 38
 <211> 17
 15 <212> ADN
 <213> Bacteria
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (7)..(11)
 20 <223> n is a, c, g, o t
 <400> 38
 tgtwawnnnn ntgtaaw 17
 <210> 39
 <211> 26
 25 <212> ADN
 <213> Bacteria
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (7)..(20)
 30 <223> n is a, c, g, o t
 <400> 39
 gkttwannnn nnnnnnnnnn kggtaw 26
 <210> 40
 <211> 16
 35 <212> ADN
 <213> Klebsiella pneumoniae
 <400> 40
 tggcacagat ttcgct 16
 <210> 41
 <211> 16
 40 <212> ADN
 <213> Klebsiella pneumoniae
 <220>
 <221> característica_misc
 45 <222> (4)..(9)
 <223> n is a, c, g, o t
 <400> 41
 tggnnnnnnw ttgcnw 16
 <210> 42
 50 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Bacteria
 <400> 42

ES 2 719 234 T3

	gcgaagcgtg ataatcatta tcggagataa tgattatcac	40
	<210> 43	
	<211> 49	
	<212> ADN	
5	<213> Bacteria	
	<400> 43	
	cttggtttt ccaagtagaa agaagattta gggcgatttt ataatatat	49
	<210> 44	
	<211> 49	
10	<212> ADN	
	<213> Bacteria	
	<400> 44	
	ccgtctttt gacggatata ttataaaatc gccctaaatc ttctttcta	49
	<210> 45	
15	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Bacteria	
	<400> 45	
	ggccgccatg gcggccgcgg gaattc	26
20	<210> 46	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Bacteria	
	<400> 46	
25	aggcggccgc gaattcacta gtg	23
	<210> 47	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Mycobacterium smegmatis	
30	<400> 47	
	caccagccga aaaggccacg g	21
	<210> 48	
	<211> 24	
	<212> ADN	
35	<213> Mycobacterium smegmatis	
	<400> 48	
	caaaaatggc cacggatccg ggtg	24
	<210> 49	
	<211> 90	
40	<212> ADN	
	<213> Staphylococcus aureus	
	<400> 49	
	gcgaagcgaa gattagaaat tatttccatg ggtatataat acttggtttt tccaagtatt	60
	atatacccat ggaaataatt tctaattcttc	90
	<210> 50	
45	<211> 90	
	<212> ADN	
	<213> Bacteria	
	<400> 50	
	gcgaagcatc ttgtatgcaa atagaatgaa taatagtttg acttggtttt tccaagtcaa	60
	actattattc attctatttg catacaagat	90

ES 2 719 234 T3

<210> 51
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Bacteria

5 <400> 51
 Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His
 1 5 10 15

Arg Leu Leu Arg Lys
 20

10 <210> 52
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 52
 aggcggccgc gaattcacta gtga 24

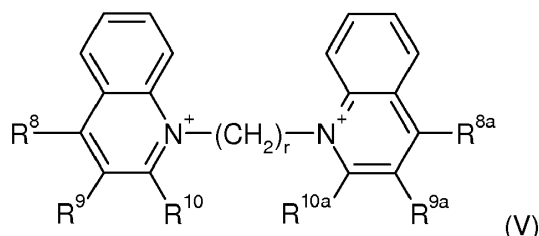
15

REIVINDICACIONES

1. Un complejo antibacteriano que comprende una secuencia de ácido nucleico y al menos un resto de administración, en donde:

a) la secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de un sitio de unión celular nativo para un factor de transcripción bacteriano; y

b) el resto de administración está representado por la Fórmula (V):



en donde:

r es un número entero de 2 a 24;

R^8 , R^9 y R^{10} son iguales o diferentes y se selecciona cada uno entre hidrógeno; alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor; alcoxi C_{1-4} opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor; nitro; amino; mono- y di-alquilamino C_{1-4} ; halógeno, fenil-alquilo C_{1-2} en donde el resto fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes metoxi, metilo o halógeno; ureido y guanidinilo; o R^9 y R^{10} se unen para formar una cadena de alquilenos $(CH_2)_w$ en donde w es de 3 a 5; y R^{8a} , R^{9a} y R^{10a} son iguales o diferentes y se selecciona cada uno entre hidrógeno; alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor; alcoxi C_{1-4} opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor; nitro; amino; mono- y di-alquilamino C_{1-4} ; halógeno, fenil-alquilo C_{1-2} en donde el resto fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes metoxi, metilo o halógeno;

ureido y guanidinilo; or R^{9a} and R^{10a} se unen para formar una cadena de alquilenos $(CH_2)_w$ en donde w es de 3 a 5;

siempre que:

(i) cuando R^{10} y R^{10a} son ambos hidrógeno o ambos son metilo, y R^9 y R^{9a} son ambos hidrógeno, entonces al menos uno de R^8 y R^{8a} son distintos de hidrógeno, amino o dimetilamino; y

(ii) when R^9 and R^{10} se unen para formar una cadena de alquilenos $(CH_2)_w$ en donde w is 4 and R^{9a} and R^{10a} se unen para formar una cadena de alquilenos $(CH_2)_w$ en donde w is 4, then at least one of R^8 and R^{8a} is other than amino.

2. Un complejo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que r es un número entero entre 8 y 14.

3. Un complejo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que r es 10 ó 12.

4. Un complejo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el resto de administración es dicloruro de 10,10'-(decano-1,10-diil) bis (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridinio).

5. Un complejo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el resto de administración es dicloruro de 10,10'-(dodecano-1,12-diil) bis (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridinio).

6. Un complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sitio de unión celular nativa comprende la secuencia de un sitio de unión a Sig bacteriano.

7. Un complejo según la reivindicación 6, en el que la secuencia de ácido nucleico tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID N°: 9, 10, 30 y 31, 39, 40 ó 41.

8. Un complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sitio de unión celular nativa comprende la secuencia de un sitio de unión de Fur bacteriano.

9. Un complejo de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la secuencia de ácido nucleico tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID N°: 11, 12 ó 13.

10. Un complejo antibacteriano que comprende:

a) una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de un sitio de unión celular nativo para un factor de transcripción, y

b) dicloruro de 10,10'-(dodecano-1,12-diil) bis (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridinio).

11. Un complejo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la secuencia de ácido nucleico tiene la secuencia establecida en las SEQ ID N°: 30 y 31.

5 **12.** Un complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas.

13. Una composición farmacéutica o medicamento que comprende un complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable.

14. Una composición farmacéutica o medicamento según la reivindicación 13, para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas.

10

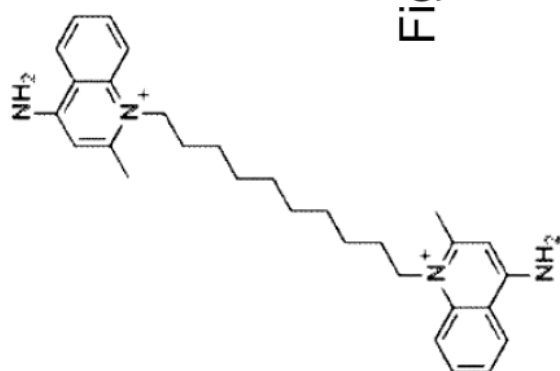


Figure 1

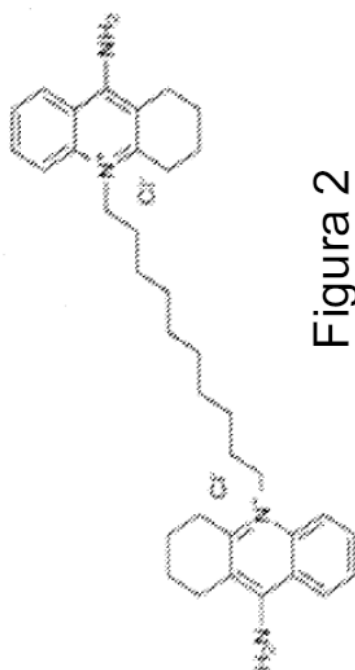


Figure 2

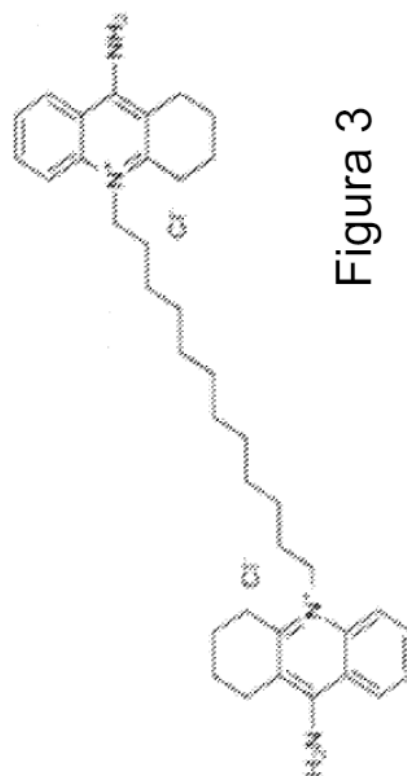


Figure 3

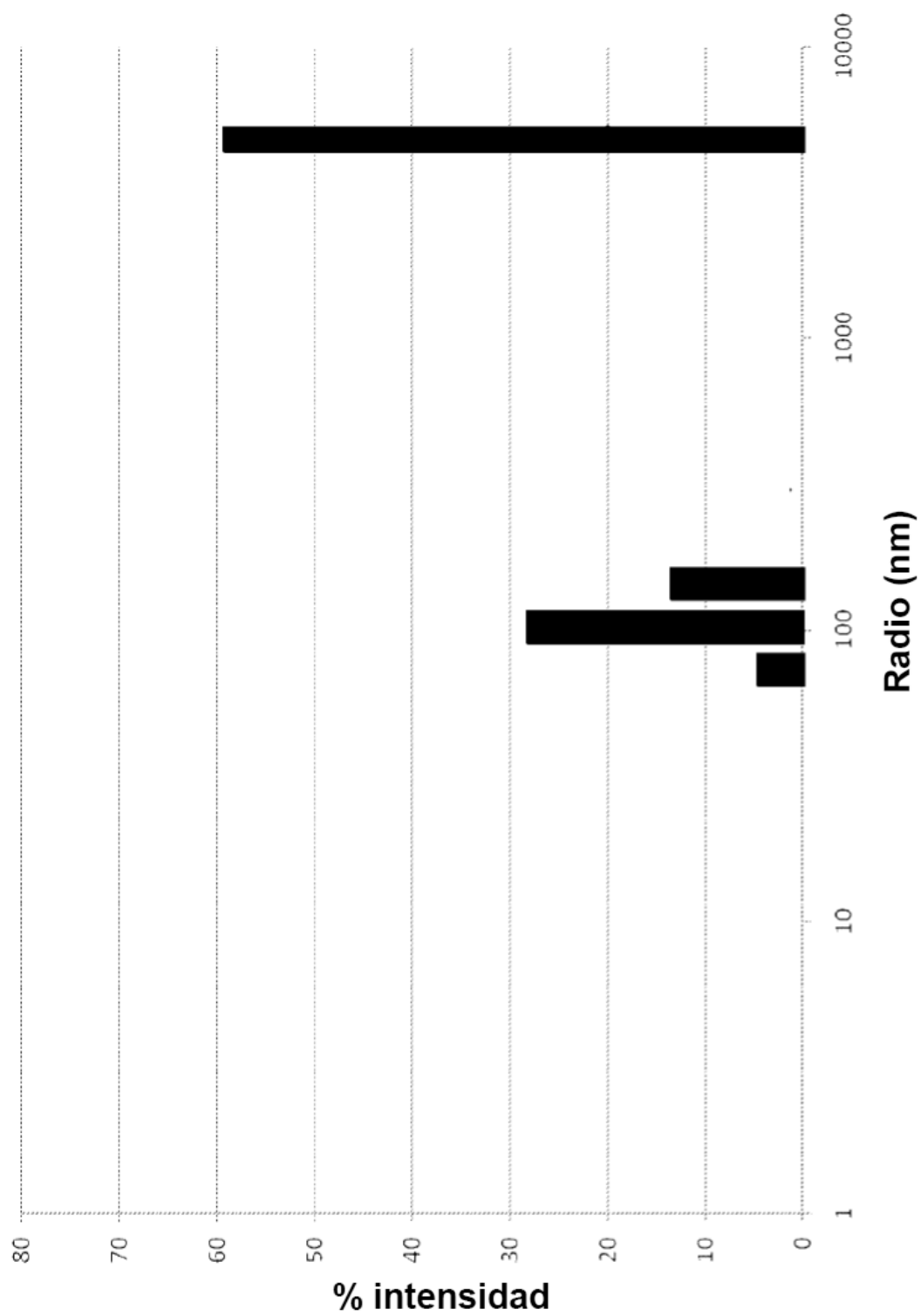


Figura 4

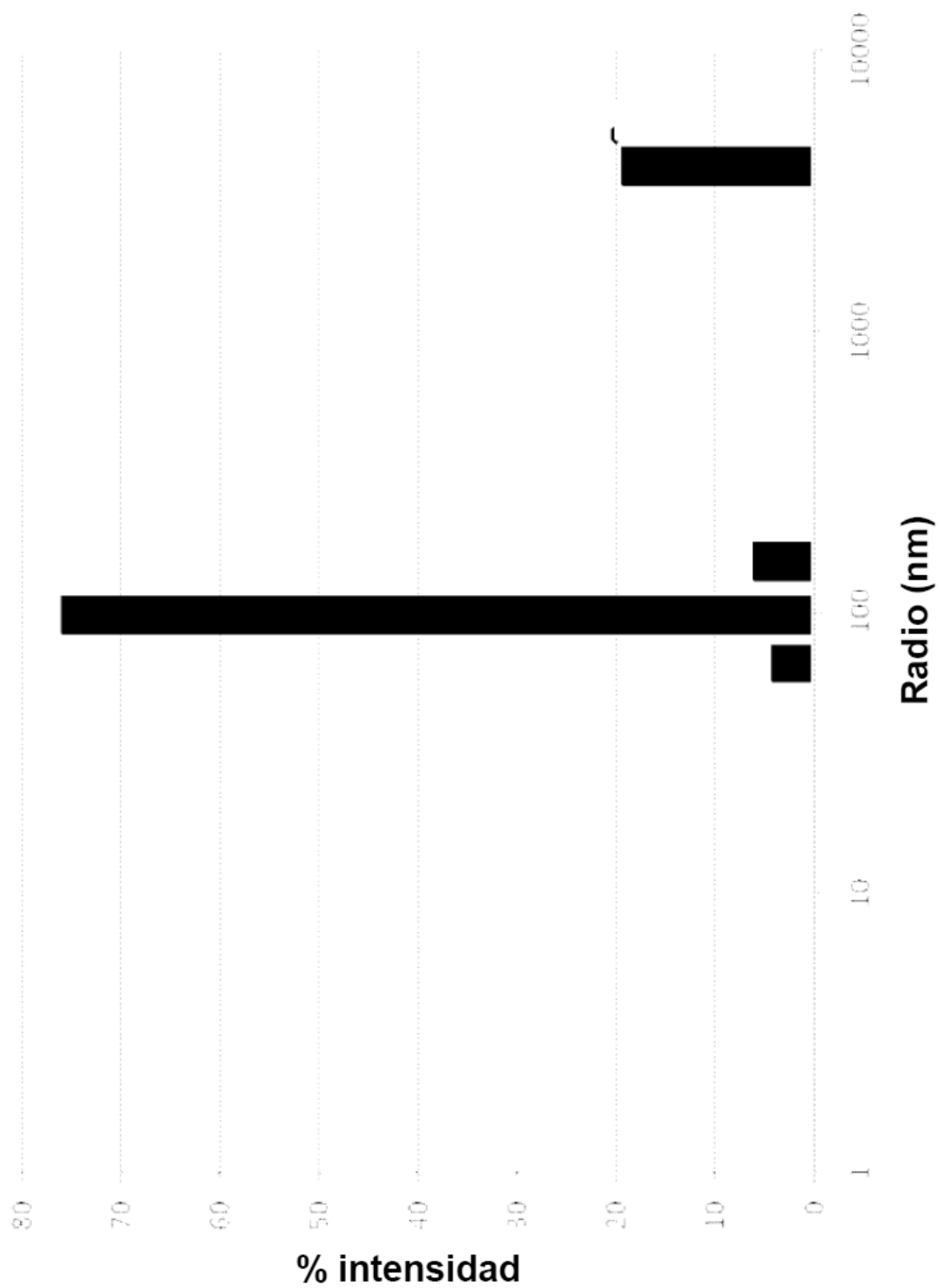


Figura 5

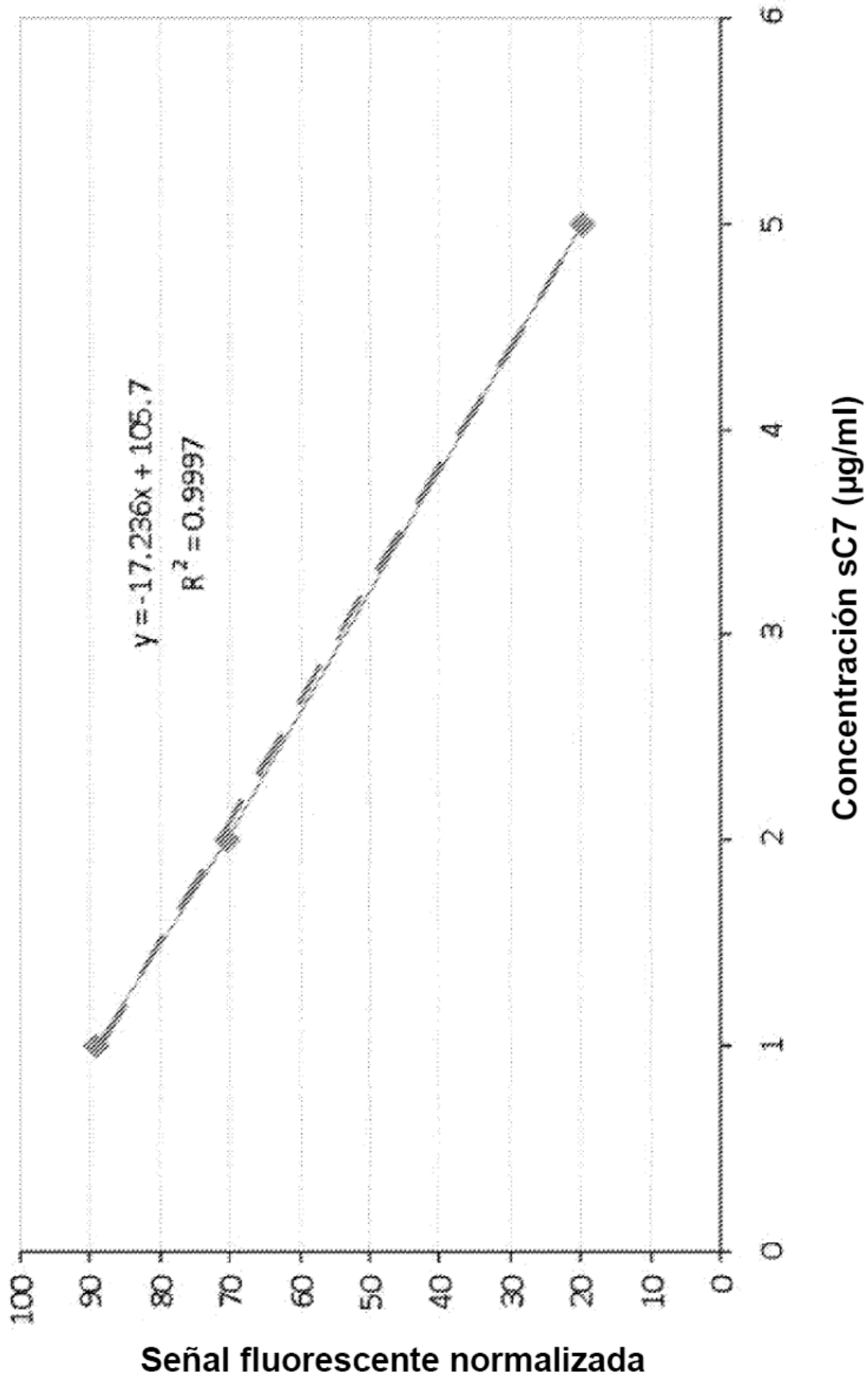


Figura 6

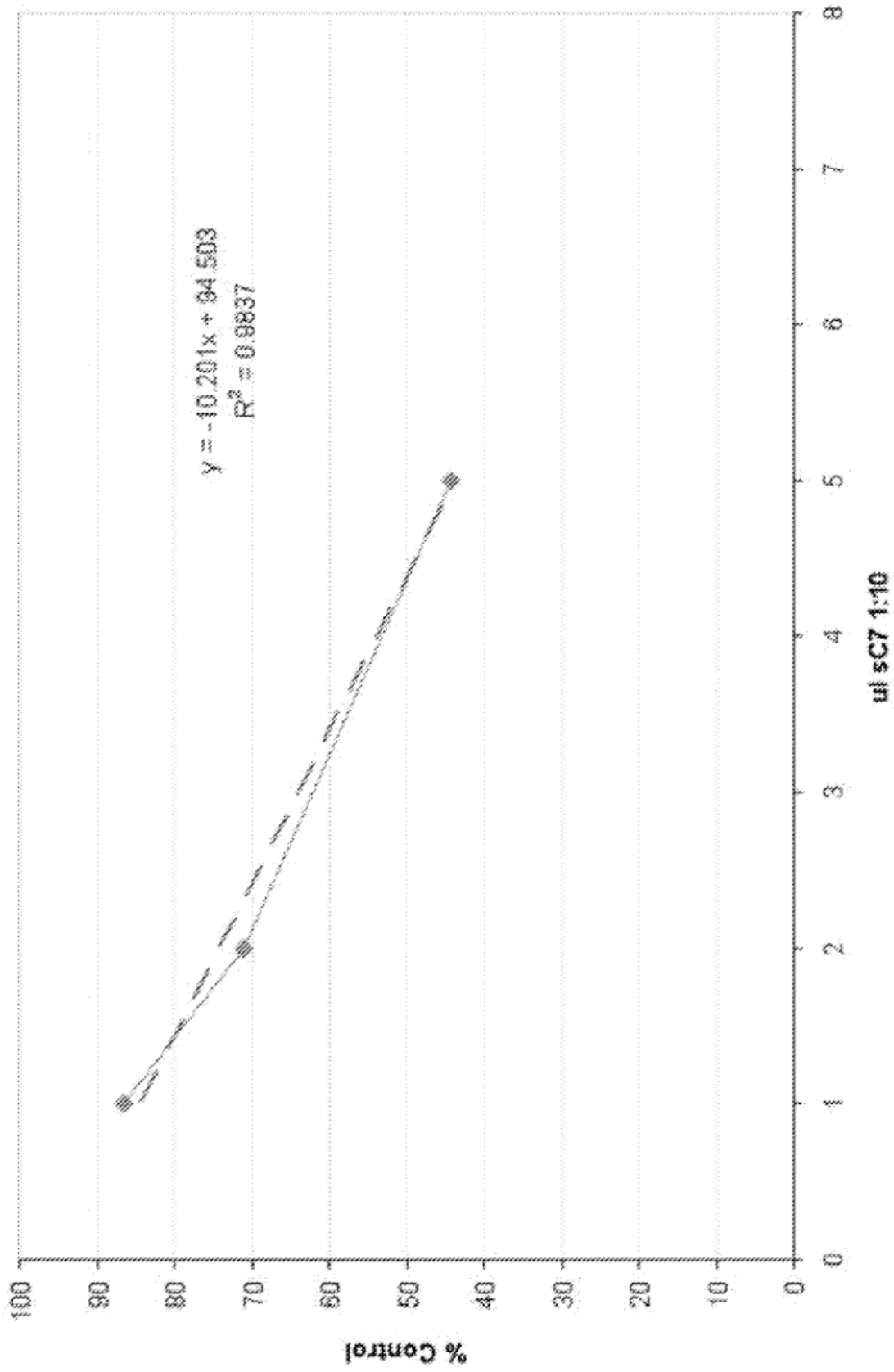


Figura 7

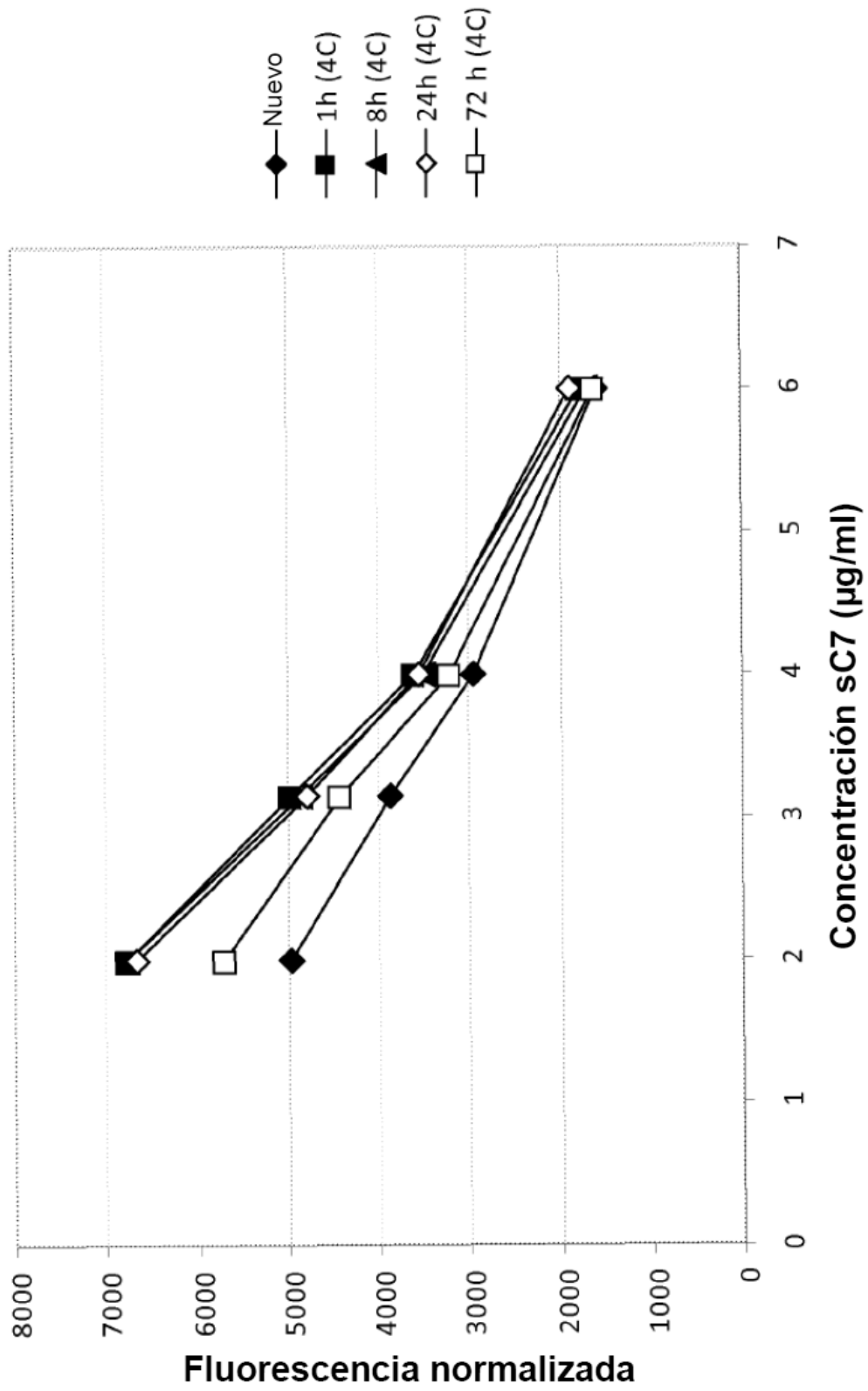


Figura 8

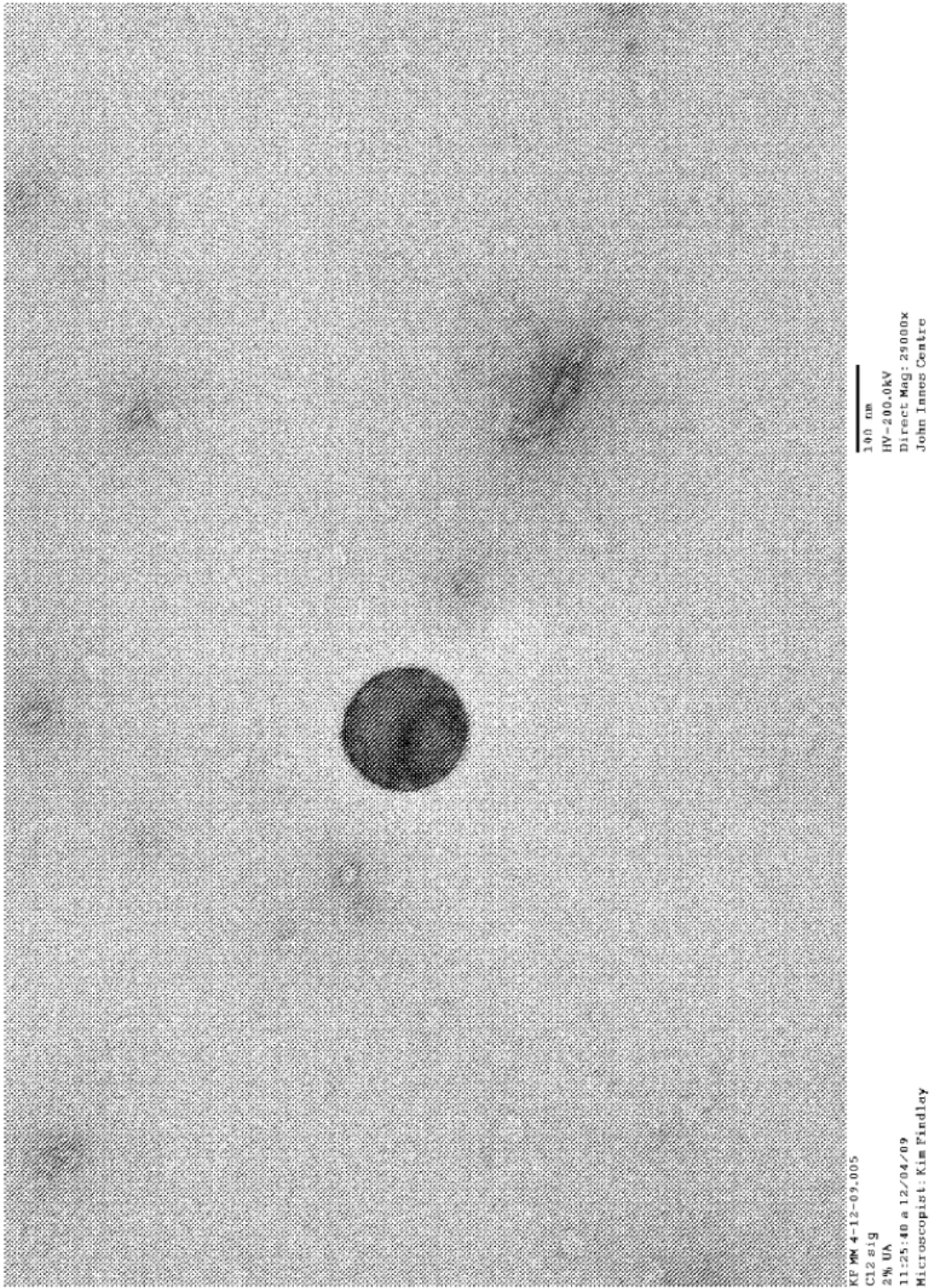


Figura 9A

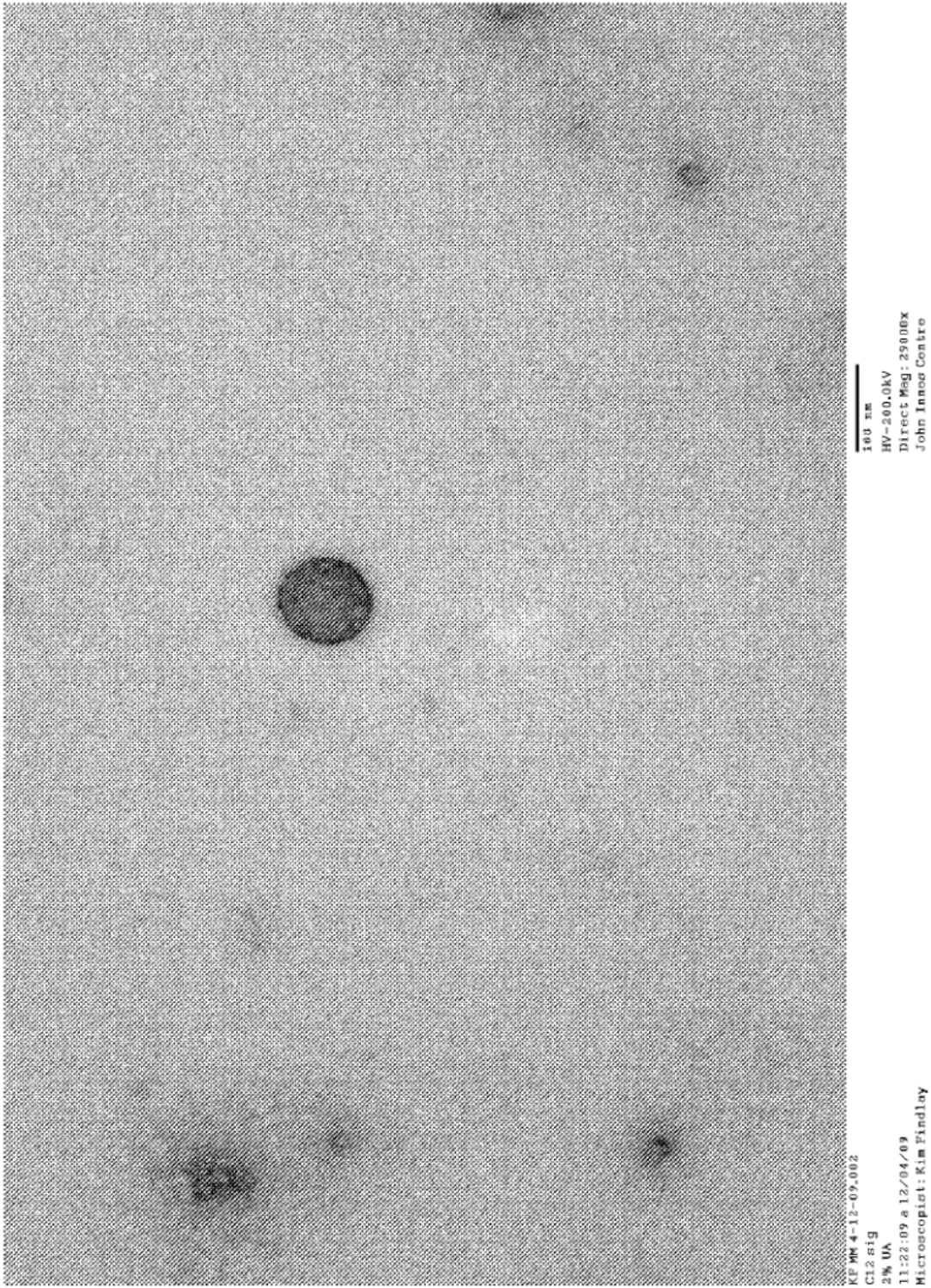


Figura 9B

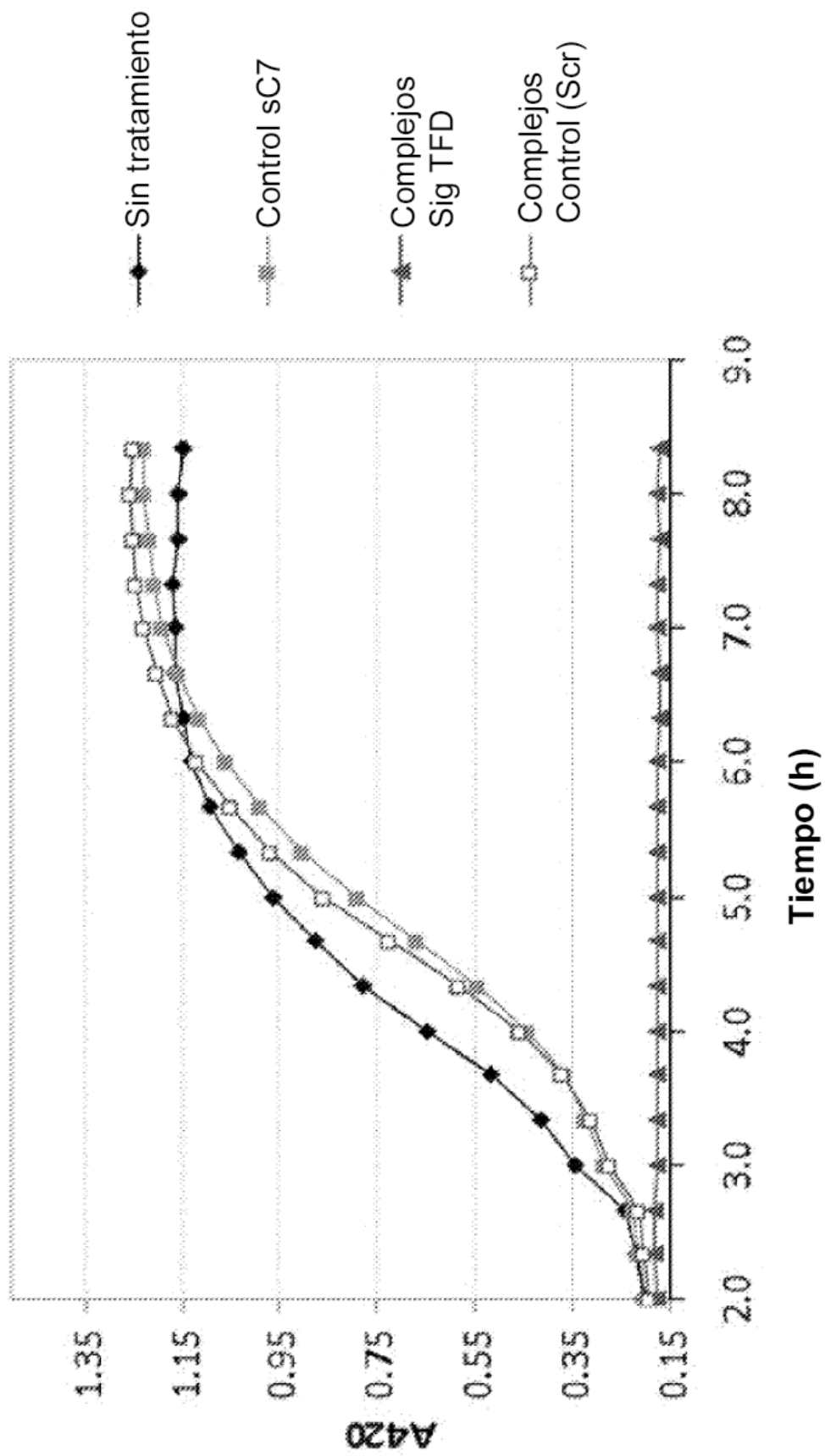


Figura 10

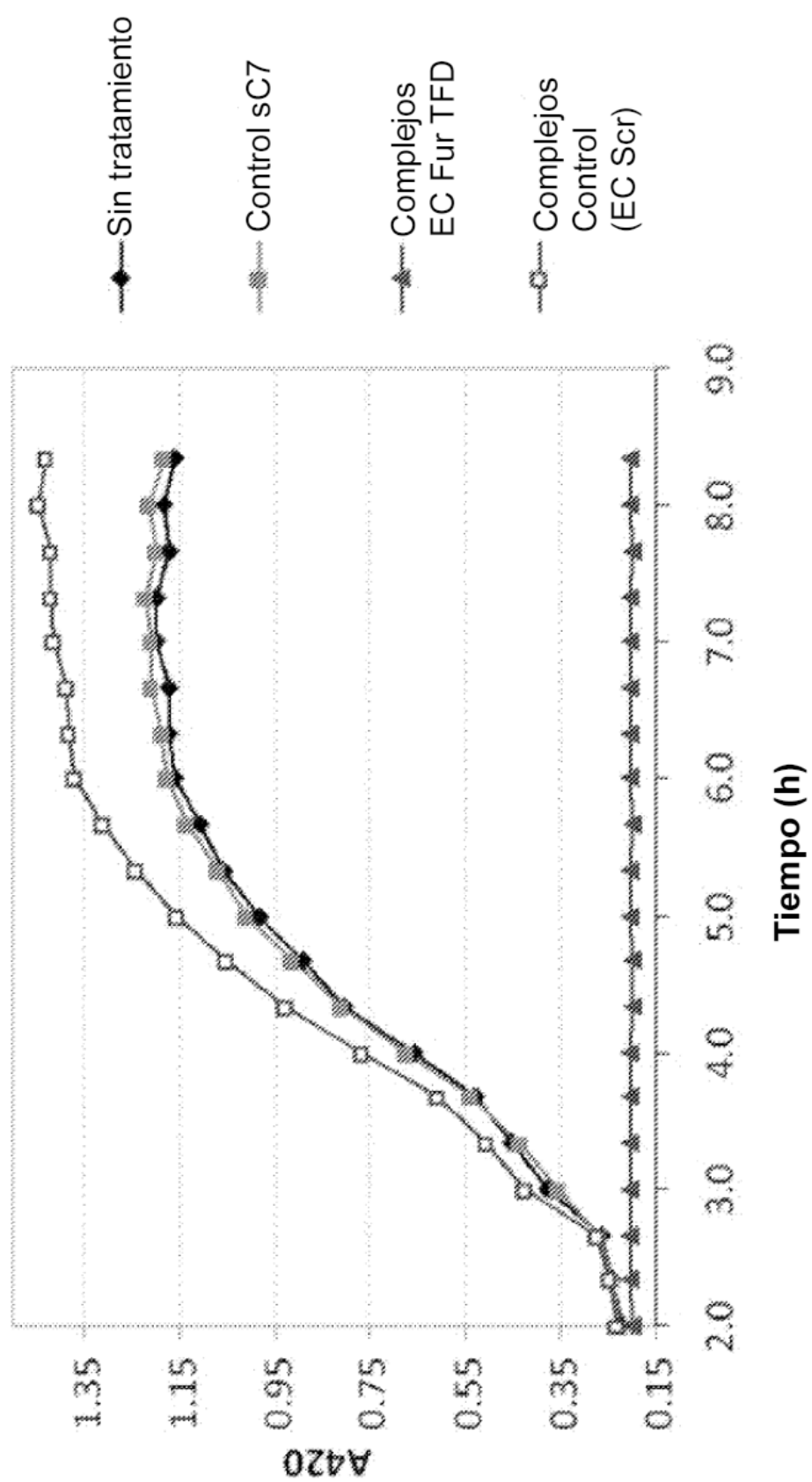


Figura 11

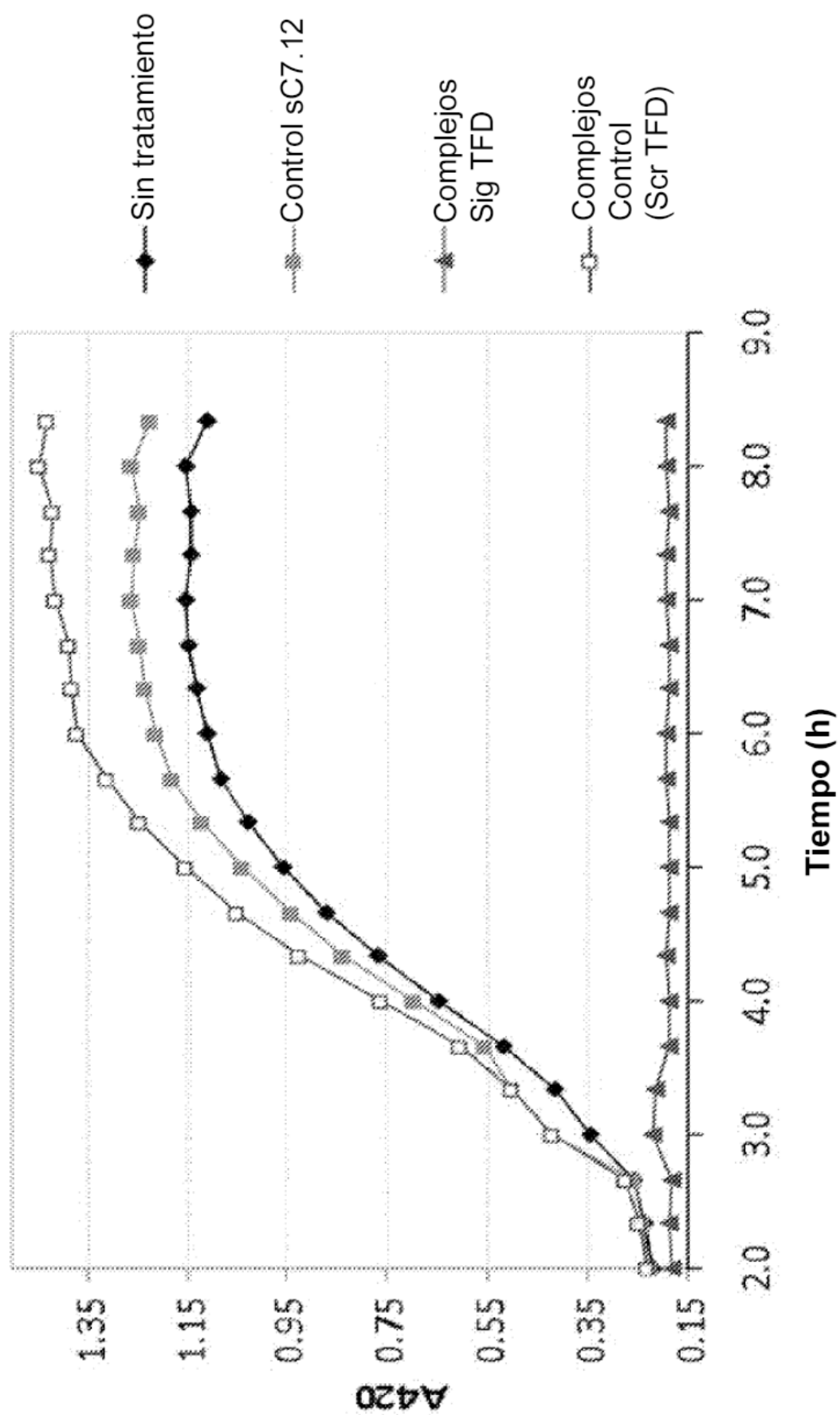


Figura 12

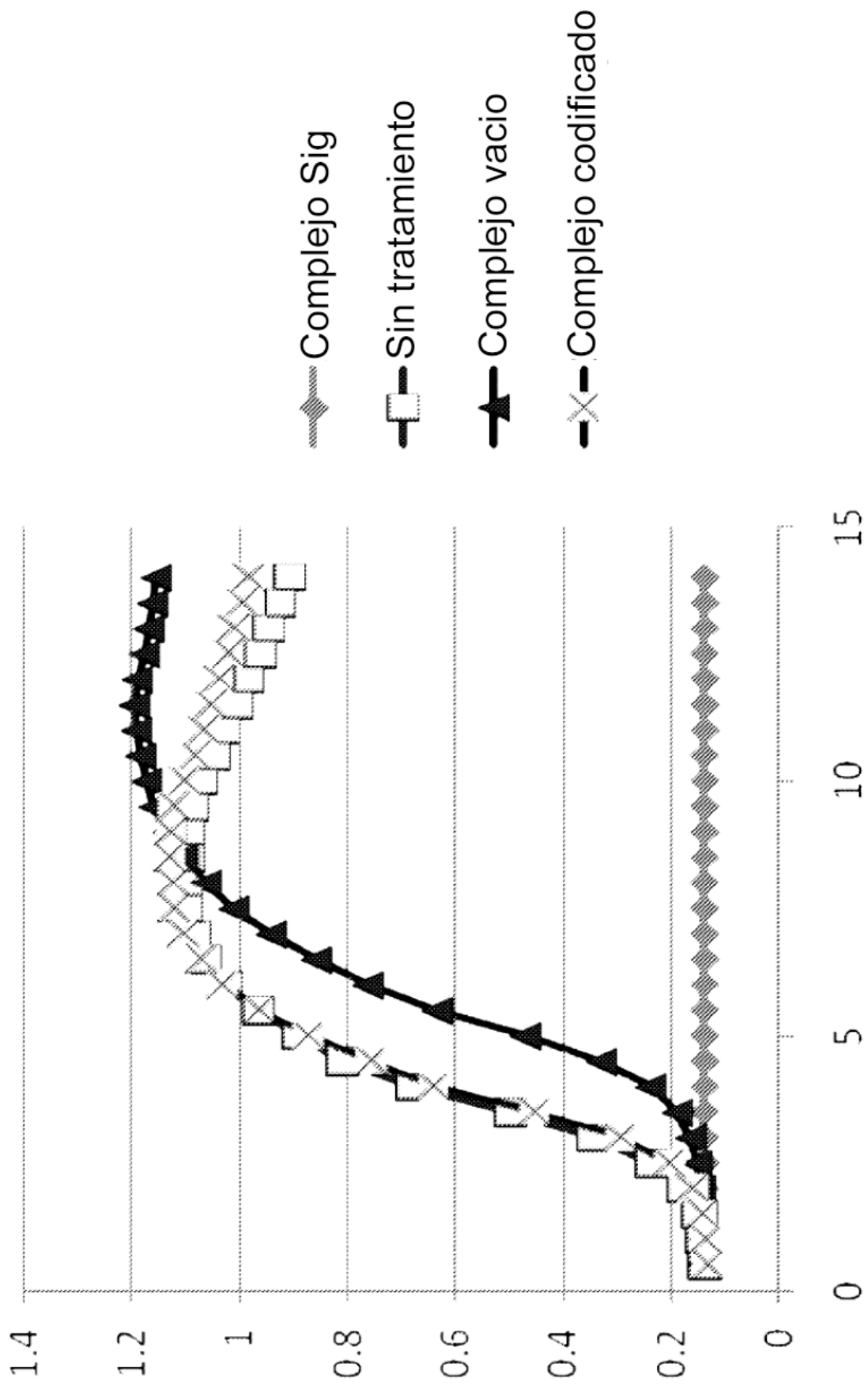


Figura 13

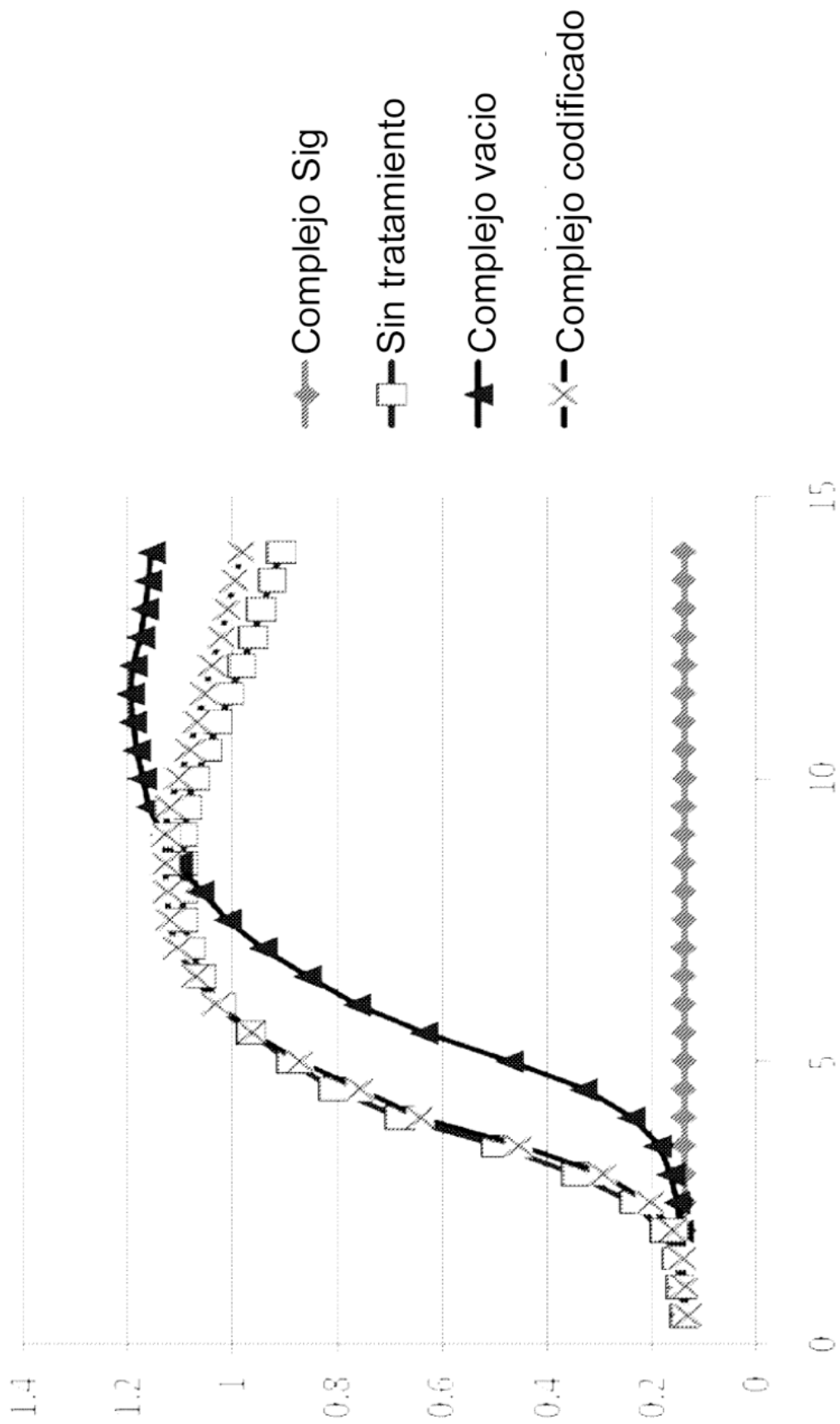


Figura 14

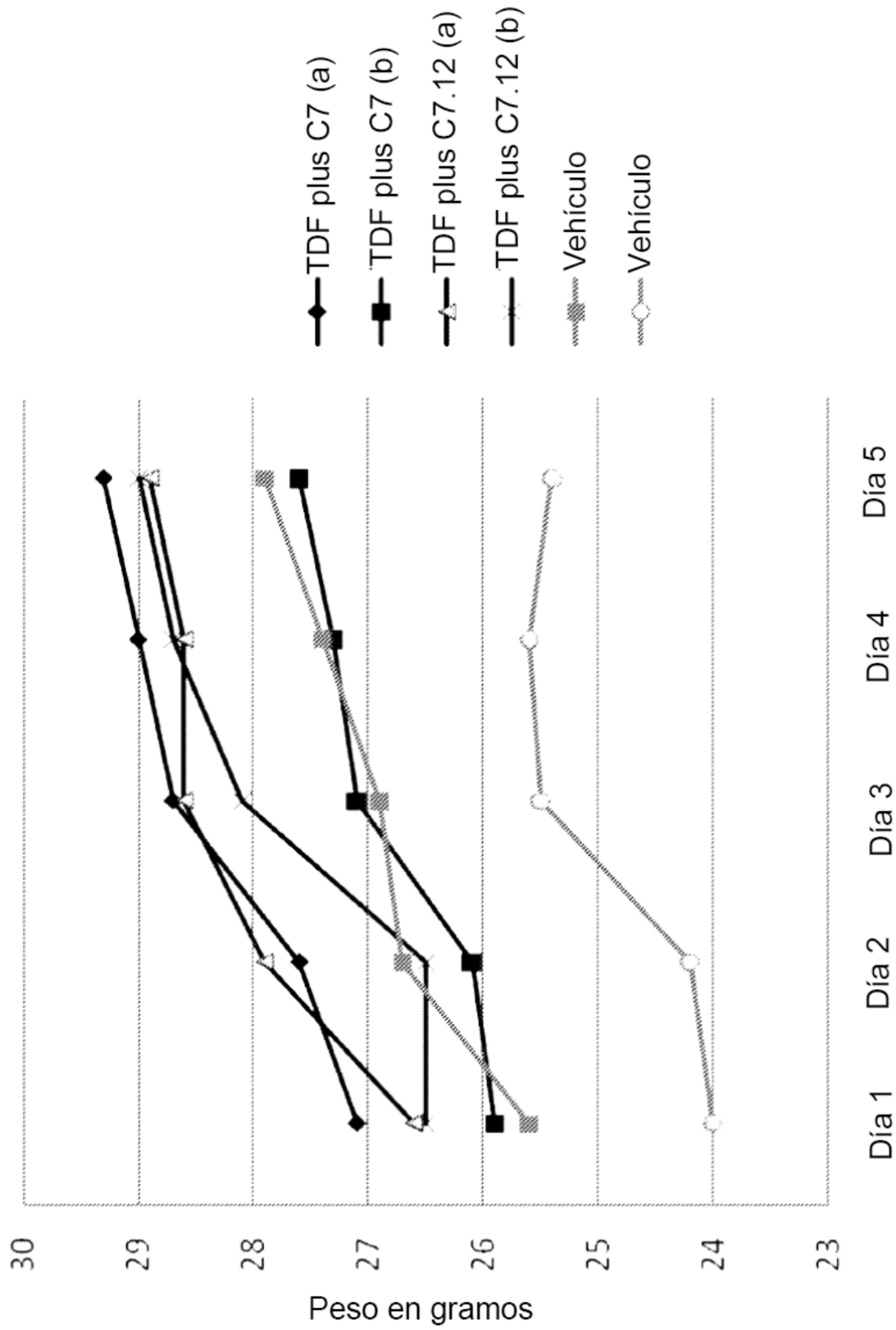


Figura 15

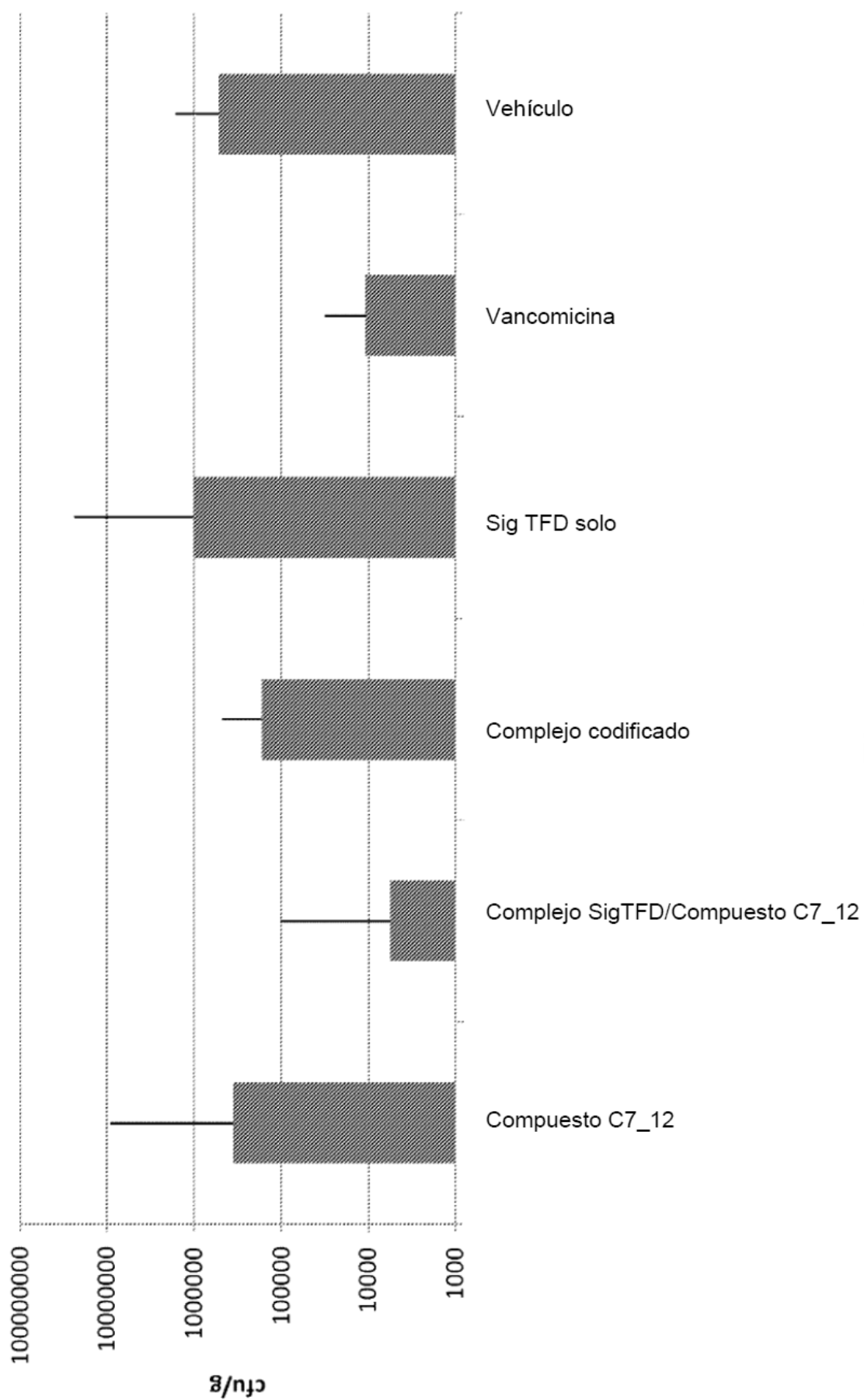


Figura 16

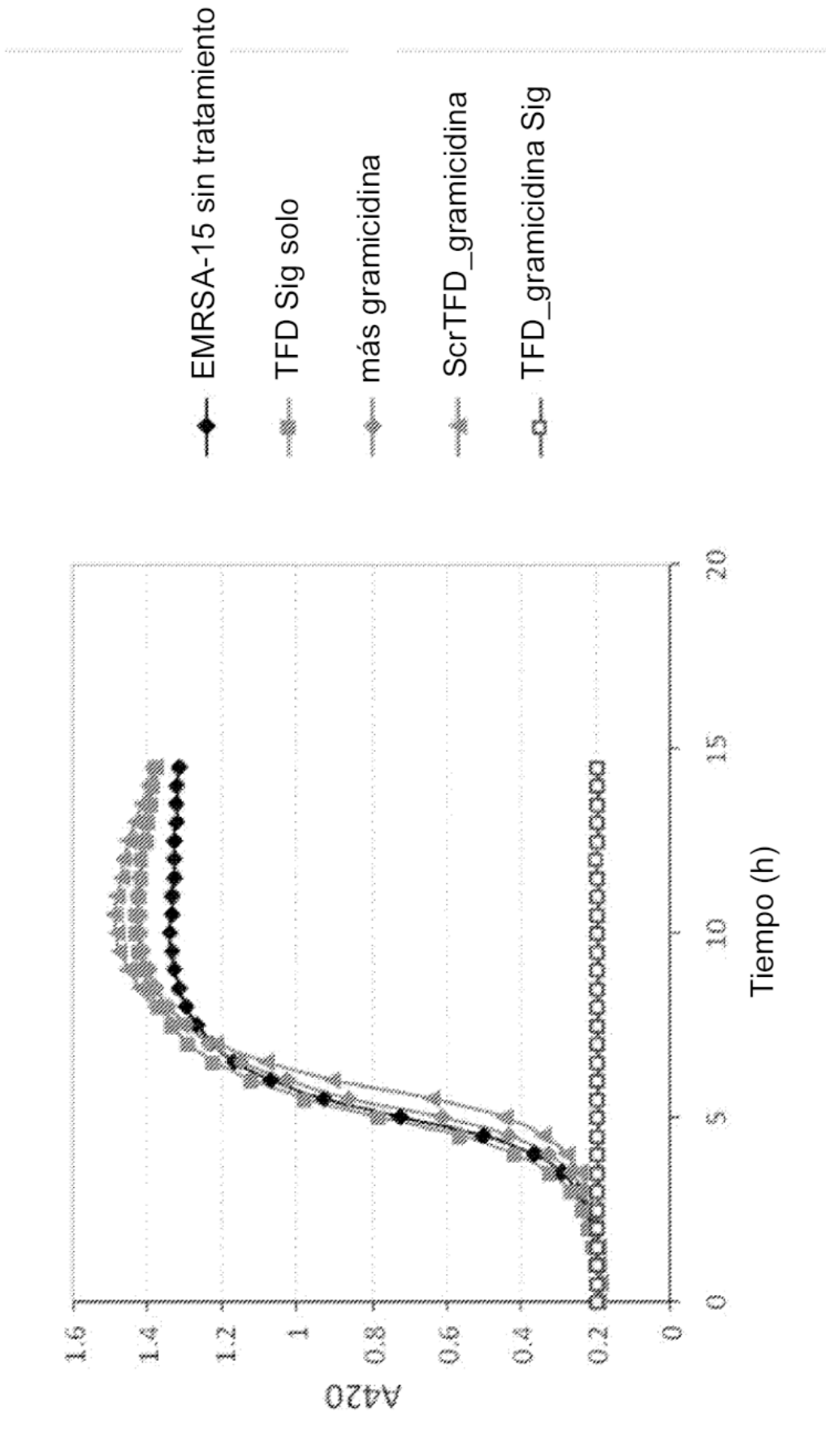


Figura 17

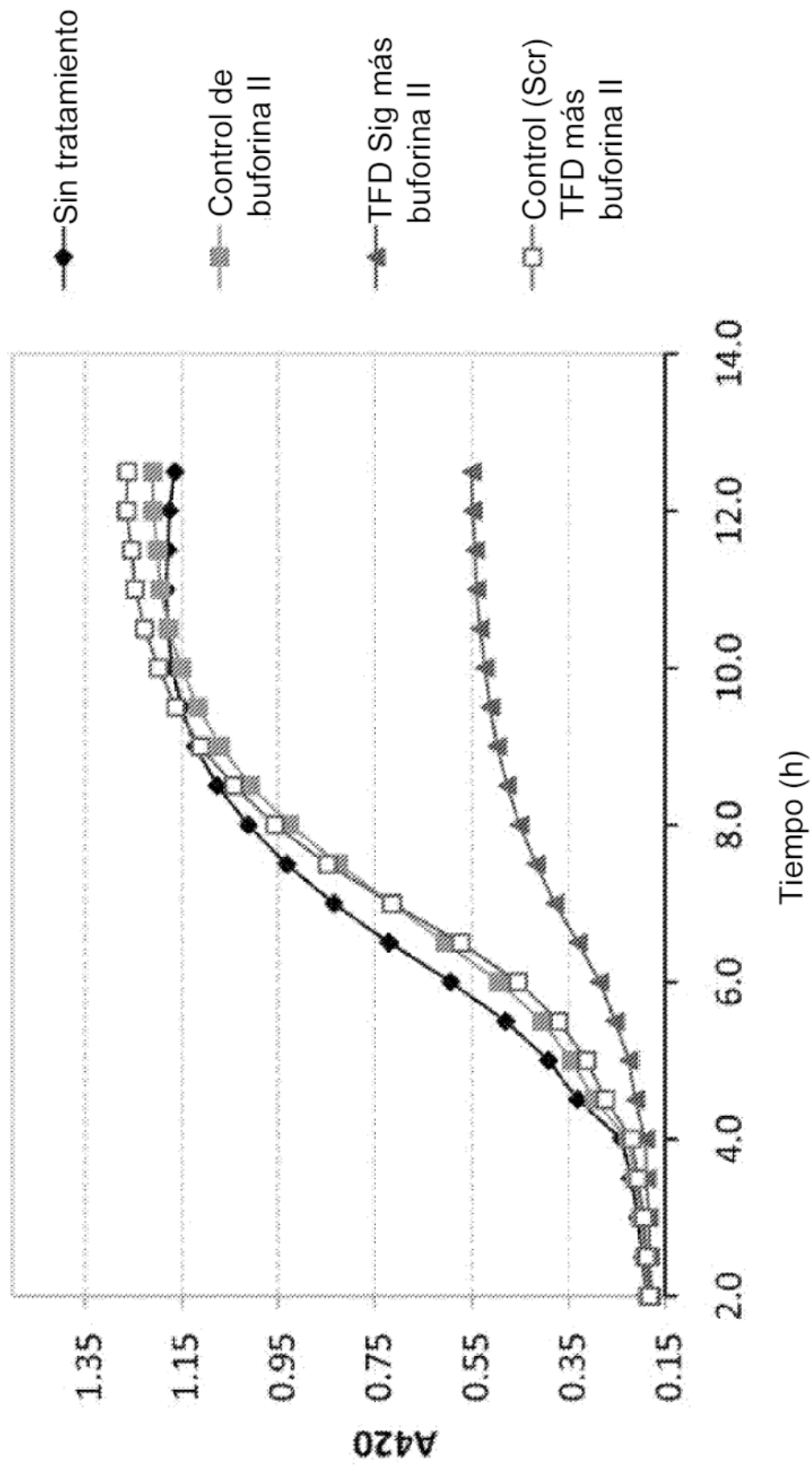


Figura 18

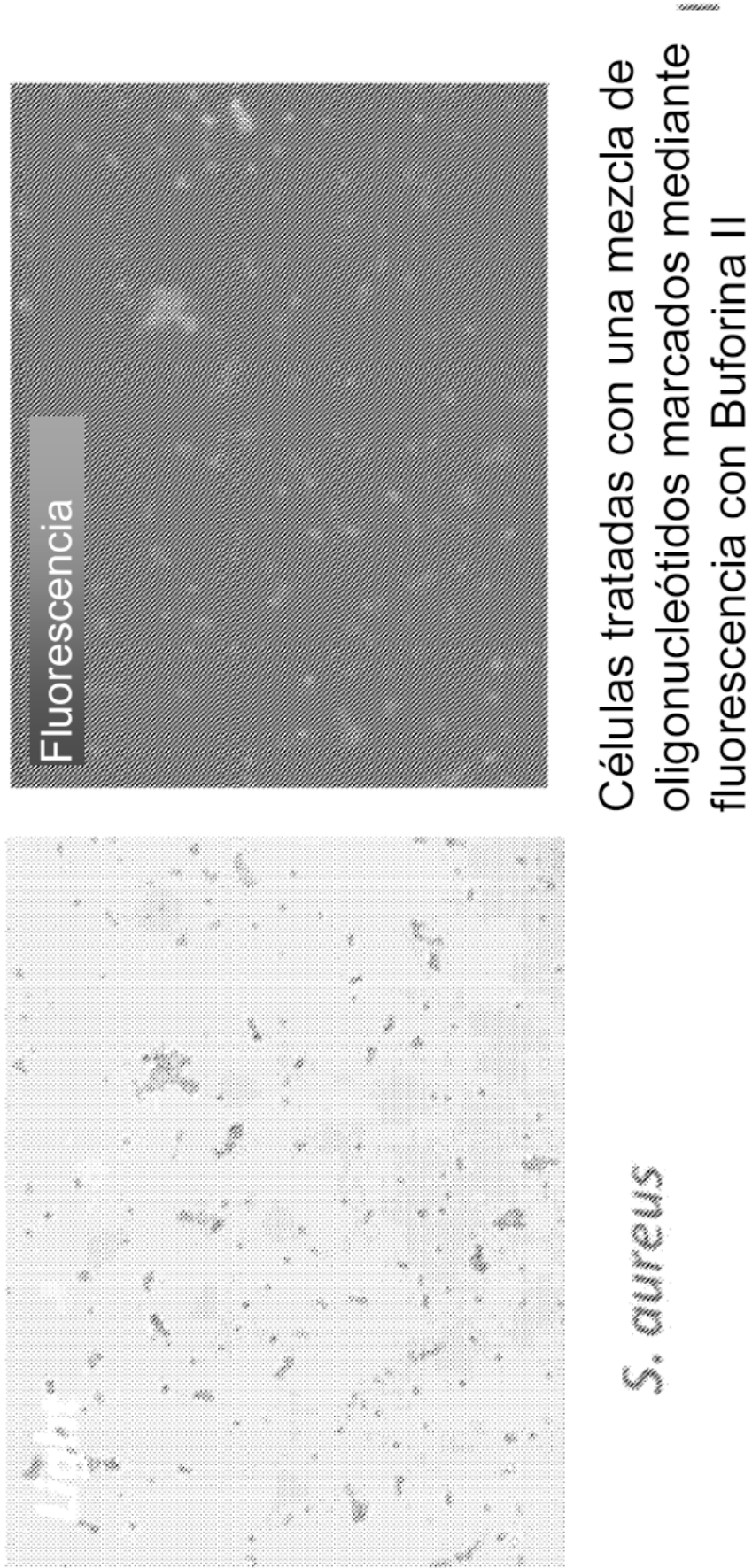


Figura 19

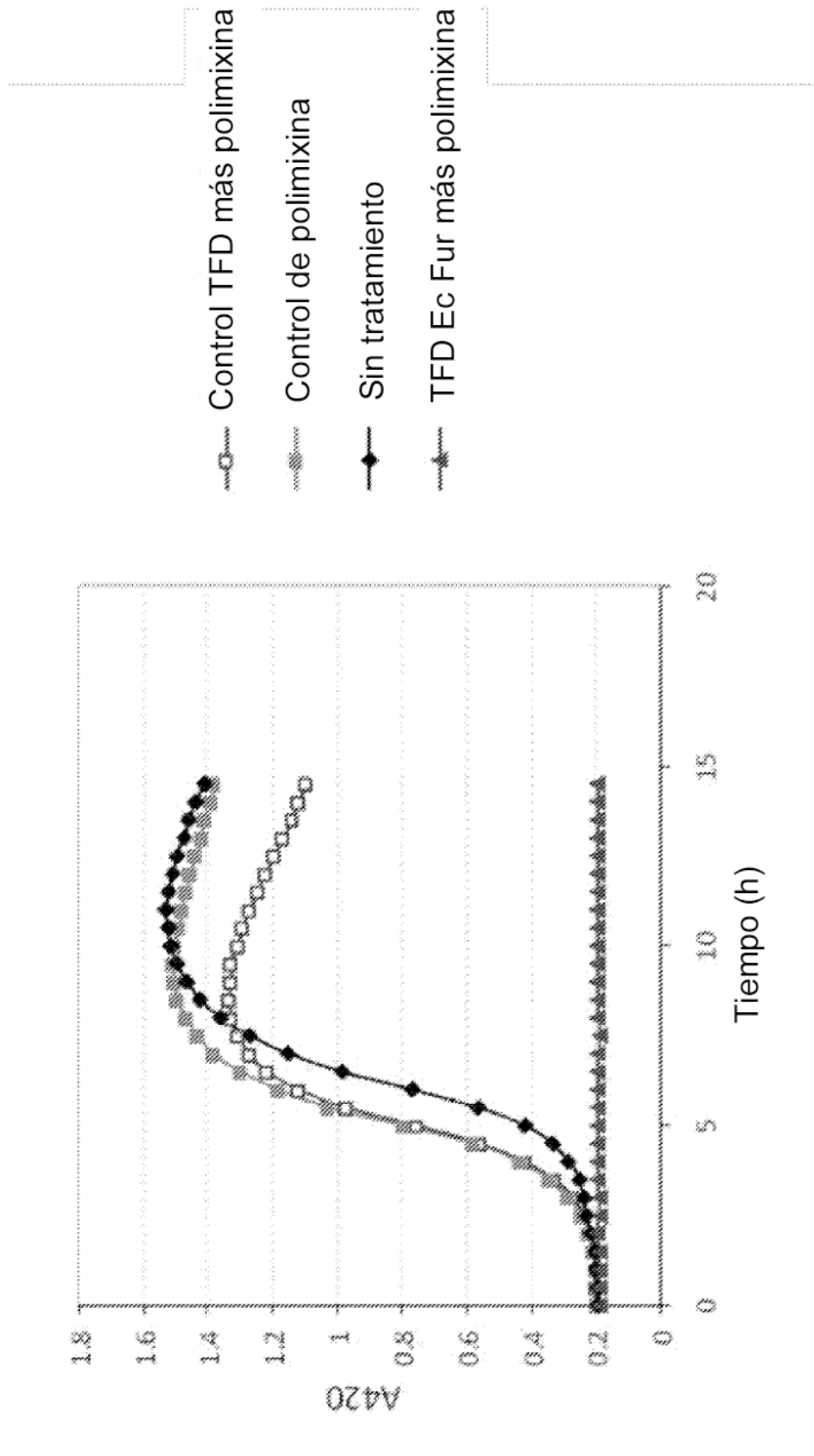
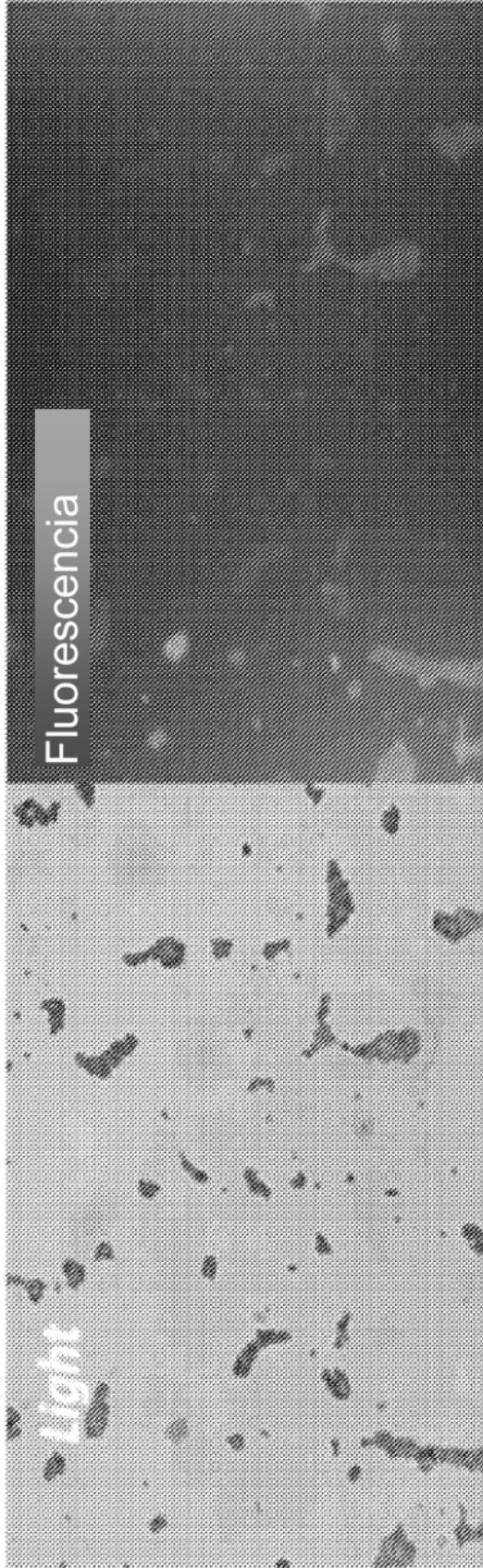


Figura 20



S. aureus

Complejos derivatizados con Buforina
II que contienen oligonucleótidos
marcados mediante fluorescencia

Figura 21

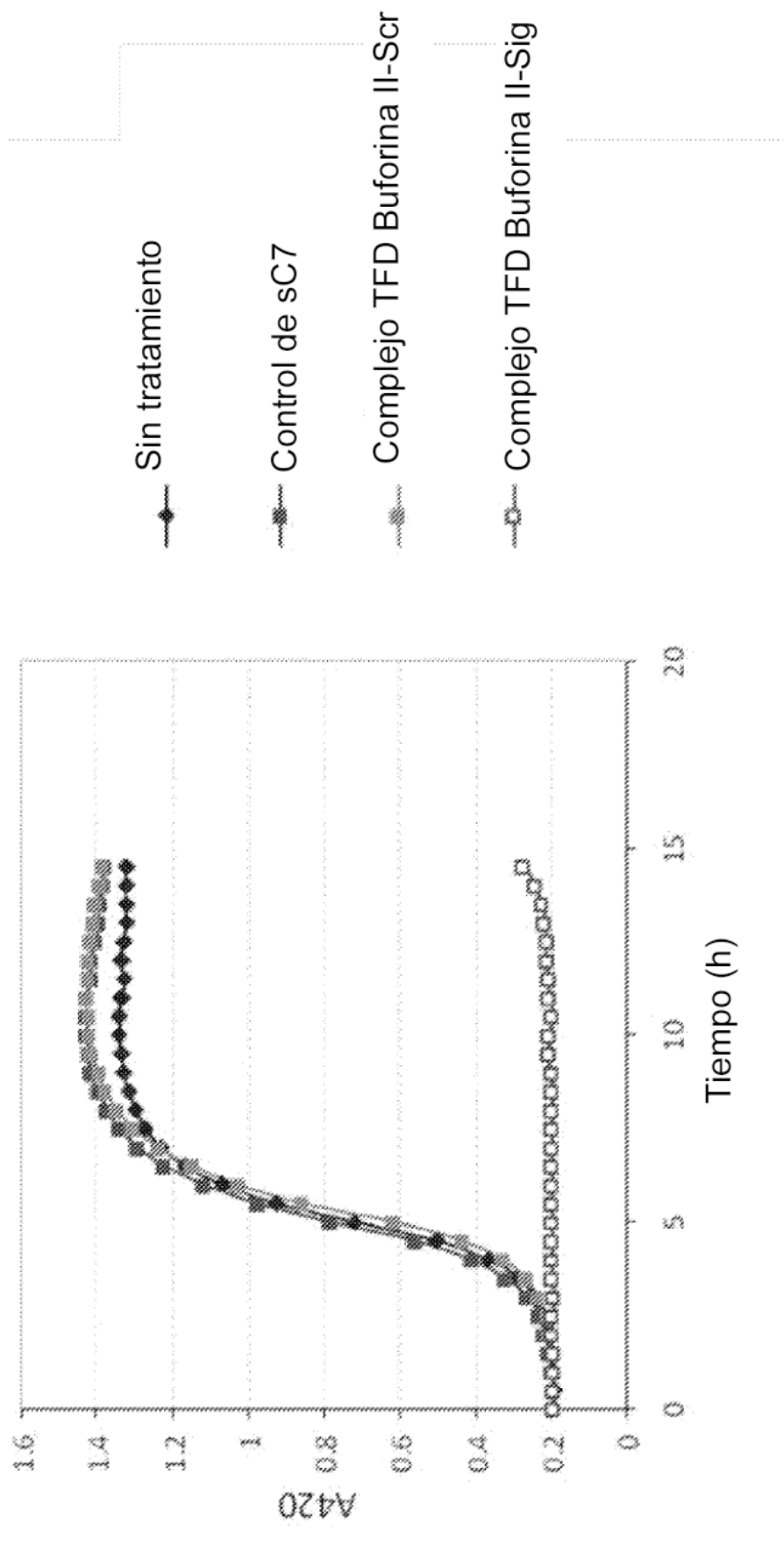


Figura 22