

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 927**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/028855**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14144442**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14762223 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 2968603**

54 Título: **Moléculas antisentido para el tratamiento de infección por Staphylococcus aureus**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361786946 P**

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

**14.04.2021**

73 Titular/es:

**TECHULON INC. (100.0%)  
2200 Kraft Drive, Suite 2475  
Blacksburg, VA 24060, US**

72 Inventor/es:

**MALONE, BRETT y  
BRYSON, JOSHUA**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 818 927 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

Moléculas antisentido para el tratamiento de infección por *Staphylococcus aureus*

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

El campo de la invención se refiere a reactivos de polinucleótidos antisentido dirigidos a proteínas de estabilidad de la membrana útiles para el tratamiento de una infección por *Staphylococcus aureus*.

10 La WO 01/49775 A2 y la WO 2007/009094 A2 describen oligómeros antisentido para su uso en el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas. La WO 2012/174543 A2 describe composiciones que comprenden polímeros y compuestos biológicamente activos para la administración de genes no virales. Hatamoto et al., Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 86 (5 de febrero de 2010), páginas 397-402 describe estudios antisentido bacterianos que usan oligómeros de ácidos nucleicos peptídicos para inhibir el crecimiento bacteriano. 15 Nekhotiaeva et al., Molecular Therapy, vol. 10 (octubre de 2004), describe el uso de ácidos nucleicos peptídicos antisentido unidos a péptidos portadores para inhibir la expresión del gen de *Staphylococcus aureus*.

## SUMARIO DE LA INVENCION

20 La invención se refiere a moléculas antisentido útiles para el tratamiento de una infección por *Staphylococcus aureus* y la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Las moléculas antisentido se dirigen a proteínas de estabilidad de membrana de *Staphylococcus aureus* y pueden comprender polímeros de ácidos nucleicos naturales y polímeros de ácidos nucleicos no naturales, con la condición de que dicha proteína de membrana no sea FmhB. Los polímeros de ácidos nucleicos no naturales incluyen polímeros con estructuras principales modificadas, como PNA, PMO, y ADN y ARN modificados sintéticamente. La invención incluye cualquier tipo de ADN o ARN modificado sintéticamente que hibrida con ADN y ARN naturales. En una realización, las moléculas antisentido están en forma de sal o complejo. En una realización, la molécula antisentido forma un complejo con una molécula polimérica catiónica. En otra realización, la molécula antisentido se conjuga con una molécula que penetra en las células. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas antisentido de la invención. 25 30

En una realización, la invención proporciona una molécula antisentido o una sal de la misma que inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* que comprende una secuencia de polinucleótidos que es antisentido a la región codificante de una proteína de estabilidad de membrana de *Staphylococcus aureus* e hibrida con dicha región codificante en condiciones fisiológicas, en donde la molécula antisentido tiene de 10 a 50 nucleobases de longitud y tiene una secuencia que es por lo menos un 80% idéntica a una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 5, y en donde dicha molécula antisentido está conjugada con una molécula de penetración celular. En otra realización, la molécula antisentido es completamente complementaria a una región codificante de una proteína de estabilidad de membrana de *Staphylococcus aureus*, con la condición de que dicha proteína de membrana no sea FmhB. En otra realización, la molécula antisentido es un oligonucleótido. En otra realización, la molécula antisentido es sustancialmente pura. En otra realización, la molécula antisentido comprende una estructura principal modificada. En otra realización, la estructura principal modificada es una estructura principal de PNA. En otra realización, la molécula de penetración celular es un péptido. En otra realización, el péptido es un péptido de penetración celular (CPP). En otra realización, la molécula antisentido forma un complejo con un polímero de administración. En otra realización, el polímero de administración es un copolímero de bloque catiónico que comprende grupos iónicos de fosfonio o amonio. 35 40 45

La invención también proporciona un método *in vitro* para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, que comprende administrar una molécula antisentido o composición de la invención a un tejido que contiene dicho *Staphylococcus aureus* o que se sospecha que contiene *Staphylococcus aureus*. En una realización, la administración es tópicamente. 50

La invención también proporciona una molécula antisentido o composición de la invención para su uso en el tratamiento de una infección por *Staphylococcus aureus*. 55

## BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

60 FIG. 1. Estudios *in vitro* de MRSA. Se demuestra la eficacia de los agentes antibacterianos de ácidos nucleicos. El péptido-PNA se probó contra bacterias en cultivo de MRSA USA 300. Se usó vancomicina para estandarizar estos resultados para estudios adicionales.

65 FIG. 2A-2B. a) Superposiciones fluorescentes de MRSA 2 horas después del tratamiento con 1  $\mu$ M de agentes de FITC-péptido. b) Recubrimientos fluorescentes de AcB 2 horas después del tratamiento con 1  $\mu$ M de agentes de FITC-péptido. Barra de escala = 100 $\mu$ m. Esta figura muestra que los péptidos de penetración celular no son tóxicos cuando se usan solos.

FIG. 3. Muestra la inhibición del crecimiento de MRSA en fase logarítmica durante 8 horas a concentraciones de 0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M de antibiótico antisentido de PNA-péptido. La parte inferior izquierda representa un control positivo (FmhB) y la parte inferior derecha muestra un control negativo.

FIG. 4 es una tabla que describe las cantidades de dosificación para un estudio de tolerabilidad de dosis única de antibiótico antisentido de PNA-péptido con criterios de valoración farmacocinéticos en ratones.

FIG. 5 es una tabla que describe el programa de dosificación para un estudio de seguridad multidosis de antibiótico antisentido de PNA-péptido en ratones.

FIG. 6 Muestra gráficos de barras de datos de seguridad para múltiples dosis de antibiótico antisentido de PNA-péptido en ratones. Se evaluaron los marcadores hepáticos (ALP, ALT, AST, CPK), los marcadores renales (BUN) y los pesos corporales de los ratones después de la administración de múltiples dosis. Gráficos de barras: marcadores hepáticos y renales. Gráfico de líneas: peso corporal del animal.

FIG. 7 Muestra un gráfico de líneas de datos de supervivencia en un modelo de infección sanguínea por *S. aureus* en ratones.

FIG. 8 Muestra la eficacia *in vivo* del antibiótico antisentido de PNA-péptido. La tabla describe la dosis y el régimen de tratamiento para ratones a los que se les inyectó MRSA y antibiótico antisentido PNA-péptido. El gráfico de barras muestra la carga bacteriana en la sangre del ratón 24 horas después del tratamiento.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

Las secuencias de polinucleótidos en el listado de secuencias incluyen las secuencias codificantes para las proteínas de estabilidad de membrana de *Staphylococcus aureus*. Ver, SEQ ID NO: 31-44.

Las secuencias de polinucleótidos en la lista de secuencias también incluyen ácidos desoxirribonucleicos antisentido (ADN) y/o ácidos nucleicos modificados, como ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Estas secuencias son capaces de anular la expresión de por lo menos la siguiente proteína de estabilidad de membrana de *Staphylococcus aureus* como se expone en la Tabla 1:

**Tabla 1. Polinucleótidos antisentido dirigidos a proteínas de estabilidad de la membrana**

Objetivo de proteína	Secuencia de polinucleótido
Alanina racemasa	CCGACATATTAC (SEQ ID NO: 6)
Proteína de división celular FtsI (Peptidoglicano sintetasa)	CATTACTACGCA (SEQ ID NO: 3)
D-alanina--D-alanina ligasa	TGTCATTTTCGTTTTTC (SEQ ID NO: 16)
Glutamato racemasa	ATTCATATTCGGTCA (SEQ ID NO: 9)
Transpeptidasa-transglicosilasa multimodular / Proteína de unión a penicilina 1A/1B (PBP1)	TCATACGCGGTC (SEQ ID NO: 5)
Transpeptidasa-transglicosilasa multimodular / Proteína de unión a penicilina 1A/1B (PBP1)	CGTCATACGCGGTCC (SEQ ID NO: 1)
Fosfo-N-acetilmuramoil-pentapéptido-transferasa	ACAAAAATCATAACT (SEQ ID NO: 10)
aminoácido ligasa propuesto encontrado agrupado con una amidotransferasa	GTCTCATGTGTTTCC (SEQ ID NO: 15)
Lípido II dependiente de ARNt-Gly--glicina ligasa (FmhB)	TCCATGATTTAT (SEQ ID NO: 30)
Lípido II dependiente de ARNt-Gly--glicina ligasa (FmhB)	TTTTCCATGATTTAT (SEQ ID NO: 28)

(continuación)

	Objetivo de proteína	Secuencia de polinucleótido
5	Lípido dependiente de ARNt II-Gly--glicina ligasa @ Lípido II dependiente de ARNt-GlyGly--glicina ligasa @ FemA, factor esencial para resistencia a meticilina	TACTCATTATCAA (SEQ ID NO: 12)
10	UDP-N-acetilglucosamina 1-carboxiviniltransferasa	CATCGTAAATCC (SEQ ID NO: 7)
	UDP-N-acetilglucosamina 1-carboxiviniltransferasa	ATCCATCGTAAATCC (SEQ ID NO: 2)
15	UDP-N-acetilglucosamina--N-acetilmuramil-(pentapéptido) pirofosforil-undecaprenol N-acetilglucosamina transferasa	TTTCGTCATTAA (SEQ ID NO: 4)
	UDP-N-acetilglucosamina--N-acetilmuramil-(pentapéptido) pirofosforil-undecaprenol N-acetilglucosamina transferasa	GATTTTCGTCATTAA (SEQ ID NO: 13)
20	UDP-N-acetilmuramato--alanina ligasa	AGTGTGTCATTATAT (SEQ ID NO: 14)
	UDP-N-acetilmuramoilalanil-D-glutamato--L-lisina ligasa	TGCATCCAAACTGAA (SEQ ID NO: 8)
25	Undecaprenil pirofosfato sintetasa	TTAAACATGGTCTTT (SEQ ID NO: 11)

El listado de secuencias también contiene secuencias de control de glicina ligasa de lípido II dependiente de ARNt (FmhB): ttttccatgattat (SEQ ID NO: 28); y control negativo no codificante (NC): aacattttgggtttt (SEQ ID NO: 29).

Las secuencias de péptidos en el listado de secuencias incluyen péptidos que se dirigen y/o localizan ácidos nucleicos y nanopartículas en células bacterianas y promueven la permeación de la membrana bacteriana. Ver Tabla 2:

**Tabla 2. Péptidos de penetración en células**

	Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos
40	Péptido KFF	KFFKFFKFFK (SEQ ID NO: 17)
	Péptido RFF	RFFRFFRFFR (SEQ ID NO: 18)
	Magainin 2	GIGKWLHSAKKFGKAFVGEIMNS (SEQ ID NO: 19)
45	Transportina 10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 20)
	Indolicidina	ILPWKWPWWPWR (SEQ ID NO: 27)
	Péptido TAT	GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID NO: 26)
50	Péptido PENETRATIN 1	RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 25)
	péptido anfipático	LLIILRRRIRKQAHASK (SEQ ID NO: 24)
	d,l-alfa-péptido cíclico	KQRWLWLW (SEQ ID NO: 23)
55	d,l-alfa-péptido cíclico	RRKWLWLW (SEQ ID NO: 22)
	d,l-alfa-péptido cíclico	KKLWLW (SEQ ID NO: 21)

#### DEFINICIONES

Los términos usados en esta divulgación tienen significados ordinarios como se usan en la técnica.

Un polímero es una cadena lineal de unidades denominadas monómeros. En un polímero, las unidades monoméricas pueden ser idénticas o pueden ser diferentes. Los polímeros pueden ser naturales (elaborados en la naturaleza) o pueden ser sintéticos. Los polímeros de la presente invención comprenden polímeros de ácidos

nucleicos, polipéptidos y polímeros de administración sintéticos.

Un ácido nucleico es un polímero lineal de nucleótidos. Los ácidos nucleicos elaborados en la naturaleza contienen las bases de desoxirribonucleótidos (ADN) adenina, citosina, guanina y timina; o las bases de ribonucleótidos (ARN) adenina, citosina, guanina y uracilo. Como se usa en la presente, polinucleótido y oligonucleótido se refieren a una molécula de ácido nucleico e incluyen ADN genómico, ADNc, ARN o ARNm de cualquier longitud. Ácido nucleico, polinucleótido, oligonucleótido son términos que pueden usarse indistintamente.

Los ácidos nucleicos modificados son polímeros no naturales que hibridan con ADN y ARN naturales con especificidad de secuencia de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick. Ejemplos de ácidos nucleicos modificados son fosforotioato-oligodesoxinucleótidos (PS-ODN), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), 2'-O-metiloligoribonucleótidos (2'O-Mes), fosforodiamidato-morfolino oligonucleótidos (PMO) y ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Los ácidos nucleicos modificados tienen estructuras principales modificadas y generalmente son más resistentes a la degradación que los ácidos nucleicos naturales. La invención incluye cualquier tipo de ADN o ARN modificado sintéticamente que hibride con ADN y ARN naturales. Ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.116.195, 5.539.082, 5.527.675, 5.623.049, 5.714.331, 5.736.336, 5.773.571, 5.786.461, 5.811.232, 5.837.459, 5.874.564, 5.891.625, 5.972.610, 5.986.053, 6.107.470, 6.174.870, 7.098.192, 7.696.345, 8.124.745, 8.354.093, 8.357.664, Wagner et al., Nucl. Acid Res. 19:5965-71 (1991); y Koshkin et al., Tetrahedron 54:3607-30 (1998).

Las moléculas antisentido de la invención también pueden estar compuestas de polímeros no naturales que hibridan con ácidos nucleicos naturales. También pueden emplearse bases nucleósidas atípicas, como bases metiladas, bases fosforiladas, inosina, tiouridina, pseudouridina, dihidouridina, queuosina y wyosina, entre otras. Ejemplos de tales polímeros antisentido que comprenden bases atípicas se divulgan en las Patente de Estados Unidos N° 7.875.733, 7.919.612, 7.939.677, 8.314.229, 8.372.969 y 8.377.898.

El término polinucleótido antisentido se refiere a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a por lo menos una parte de una secuencia de nucleótidos objetivo de interés e hibrida con la secuencia de nucleótidos objetivo en condiciones fisiológicas. Las moléculas antisentido hibridan específicamente con uno o más ácidos nucleicos que codifican un ácido nucleico objetivo preseleccionado. Los términos ácido nucleico objetivo y ácido nucleico que codifica el objetivo abarcan ADN que codifica el objetivo, ARN (incluyendo pre-ARNm y ARNm) transcrito a partir de dicho ADN y también ADNc derivado de dicho ARN. La hibridación de un compuesto antisentido con su ácido nucleico objetivo interfiere con la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico objetivo por compuestos que hibridan específicamente con él se denomina generalmente antisentido. Las funciones del ADN que se van a interferir incluyen la replicación y la transcripción. Las funciones del ARN que se va a interferir incluyen todas las funciones vitales como, por ejemplo, la translocación del ARN al sitio de traducción de la proteína, la traducción de la proteína del ARN, el corte y empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm, y la actividad catalítica que puede estar involucrada o facilitada por el ARN. El efecto general de tal interferencia con la función del ácido nucleico objetivo es la modulación de la expresión del objetivo. En el contexto de la presente invención, modulación significa o un aumento (estimulación) o una disminución (inhibición) en la expresión de un gen. En el contexto de la presente invención, la inhibición es la forma de modulación de la expresión génica.

Los polinucleótidos se describen como complementarios entre sí cuando la hibridación se produce en una configuración antiparalela entre dos polinucleótidos de cadena sencilla.

El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que deben introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad y similitud entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático (ver, por ejemplo, Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias se determina en base a alineaciones generadas con el algoritmo de Clustal W (Thompson, J.D. et al., 1994, Nucleic acid Res. 22:4673-4680). Este algoritmo está incorporado en muchos paquetes de software comerciales, en este caso el programa de software alignX en la suite Vector NTI (versión 8.0). Los parámetros de Clustal W predeterminados se usaron para generar alineaciones por pares a partir de las cuales se calcularon los valores de identidad porcentuales (penalización de apertura de hueco de 10; penalización de extensión de hueco de 0,1). El porcentaje de identidad se define como el número de bases idénticas dividido por el número total de bases y multiplicado por 100. Si las secuencias en la alineación son de diferentes longitudes (debido a huecos o extensiones), se usará en el cálculo la longitud de la secuencia más larga, que representa el valor de la longitud total.

Las proteínas son polímeros que contienen una o más cadenas de aminoácidos unidas entre ellas por enlaces peptídicos. Las proteínas se pliegan típicamente en una forma tridimensional, facilitando una función biológica.

5 Un polipéptido es un polímero de aminoácidos unidos entre ellos mediante enlaces peptídicos. Los términos proteína y polipéptido y péptido se usan generalmente de manera intercambiable, aunque los polipéptidos y péptidos son generalmente de longitud más corta que las proteínas.

10 Los términos cargado, no cargado, catiónico y aniónico se refieren al estado predominante de una fracción química a pH casi neutro, por ejemplo, aproximadamente de 6 a 8. En una realización, el término se refiere al estado predominante de la fracción química a pH fisiológico, que es, aproximadamente de 7,4. Por tanto, un enlace de estructura principal catiónica se carga predominantemente positivamente a pH 7,4.

15 El término sustancialmente puro significa que la molécula antisentido está sustancialmente libre de otros materiales como otros ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, carbohidratos y otros materiales con los que puede estar asociada de manera natural. En una realización, las moléculas antisentido sustancialmente puras son un 95-95% homogéneas por HPLC. En otra realización, las moléculas antisentido sustancialmente puras son un 99-100% homogéneas por HPLC.

## 20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención puede entenderse por referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones de la invención y los ejemplos incluidos en la presente. La terminología usada en la presente tiene el propósito de describir realizaciones de la invención y no se pretende que sea limitativa.

25 Los aspectos específicos de la invención incluyen moléculas antisentido que son útiles para el tratamiento de una infección por *Staphylococcus aureus* y/o inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus* que comprende una molécula antisentido que es antisentido para una región codificante de proteína de estabilidad de membrana de *Staphylococcus aureus* en condiciones fisiológicas. En una realización, la molécula antisentido hibrida con una región codificante de estabilidad de membrana de *Staphylococcus aureus* seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 1 o 5. En una realización, la molécula antisentido contiene 10-50 nucleobases, es decir, es una 10-50-mer. La secuencia de nucleótidos para la molécula antisentido se elige en una localización de unión que preferiblemente abarca el codón de inicio. El software patentado escanea tamaños de ventana de 10 bases, 11 bases, 12 bases, 13 bases, 14 bases, 15 bases, 16 bases, 17 bases, 18 bases, 19 bases y/o 20-40 bases (como ejemplo no limitativo) incluyendo el codón de inicio y clasifica el potencial de auto-plegado por contenido de bases. El algoritmo de software puede programarse para abarcar el codón de inicio. Alternativamente, el algoritmo puede programarse para abarcar opcionalmente la región del codón de inicio. La selección de la secuencia antisentido se puede finalizar manualmente a partir de estos datos o mediante un proceso automatizado derivado de datos empíricos y ponderación de parámetros. Estas moléculas antisentido contra genes expresados en proteínas de estabilidad de membrana son sustancialmente ortogonales al transcriptoma humano. En una realización, las moléculas antisentido tienen longitudes de bases que muestran características como una Tm de más de 37° C, auto-plegado bajo, y superposición significativa del codón de inicio.

45 En otra realización, la invención proporciona una secuencia de polinucleótidos por lo menos un 80% idéntica a una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1 o 5. Específicamente, las secuencias pueden contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones con nucleótidos naturales o no naturales, de tal manera que la actividad de modulación del gen objetivo no disminuye sustancialmente. Las variantes muestran por lo menos aproximadamente un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% u 89% de identidad de secuencia; y otra realización por lo menos aproximadamente un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 1 o 5. El porcentaje de identidad puede determinarse fácilmente comparando las secuencias de los polinucleótidos con la porción correspondiente del polinucleótido objetivo, usando cualquier método, incluido el uso de algoritmos informáticos bien conocidos por los expertos en la técnica. Los algoritmos incluyen el algoritmo Align o BLAST (Altschul, 1991 J. Mol. Biol. 219:555-565; Henikoff y Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919).

55 En una realización de la invención, el ingrediente activo se acopla a una molécula de direccionamiento/penetración celular. En un aspecto de la invención, la molécula de direccionamiento comprende un péptido. El péptido puede comprender un péptido de penetración celular (CPP). Los péptidos utilizados pueden tener una o más funciones para facilitar el direccionamiento celular y/o la permeación de la membrana. En particular, los polinucleótidos terapéuticos de la invención pueden administrarse a *Staphylococcus aureus* en un huésped conjugando péptidos con la molécula antisentido. La capacidad de conjugar moléculas antisentido con péptidos para la alteración de la membrana de las bacterias proporciona especificidad y reduce la toxicidad. Los ejemplos de péptidos de penetración celular incluyen los que tienen las SEQ ID NO: 17-27. Ejemplos adicionales de péptidos de penetración celular y métodos para unirlos a moléculas antisentido se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 8.354.387, 8.354.093, 8.313.778, 8.299.236, 8.242.081, 8.211.468, 8.207.293, 8.138.383, 8.044.019, 8.039.587,

7.943.581 y 7.879.813. En otra realización, los péptidos de penetración celular se derivan de la tat del VIH, el virus del herpes VP22, el producto del gen homeobox de *Drosophila Antennapedia*, las secuencias señal, las secuencias de fusión o la protegrina I como se describe en Patente de EE.UU. 8.338.366. El conjugado molécula antisentido-péptido se puede preparar mediante métodos de síntesis en fase sólida, en los que la cisteína sirve como enlazador entre el péptido y el ADN. Se pueden usar otras metodologías conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Dirksen, A., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2006. 128, 15602-3).

Los CPP útiles en la invención son péptidos de diversos orígenes. Los péptidos portadores de ácidos nucleicos catiónicos forman nanopartículas productivas cuando se mezclan con los polímeros sintéticos de la invención. Un ejemplo es el péptido KFFKFFKFFK (SEQ ID NO: 17) descrito en Xie et al., *Molecular Therapy* 2004, 10, 652-659. Los péptidos adicionales pueden incluir péptido TAT y PENETRATINA. El péptido TAT, GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID NO: 26), se deriva del transactivador de la transcripción (TAT) del virus de la inmunodeficiencia humana y es un CPP. Los CPP superan la barrera lipofílica de las membranas celulares y suministran moléculas y partículas grandes dentro de la célula para sus acciones biológicas. El péptido PENETRATINA es un péptido de 16 aminoácidos de secuencia RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 25) correspondiente a la tercera hélice del homeodominio de la proteína *Antennapedia*.

Los CPP útiles también abarcan d,l- $\alpha$ -péptidos cíclicos, como KQRWLWLW (SEQ ID NO: 23), RRKWLWLW (SEQ ID NO: 22) y KKLWLW, (SEQ ID NO: 21) como se describe en Fernandez-Lopez et al., *Nature* 2001, 412, 452-455. Estos péptidos tienen propiedades antibióticas propias y también funcionan como portadores de carga para la administración celular interna. Además, los péptidos anfipáticos LLILRRRIRKQAHASK (SEQ ID NO: 24) y transportina 10 (TP10), AGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 20), descritos en Nekhotiaeva et al. *FASEB J.* 2010, 394-396, forman nanopartículas productivas. Péptidos ricos en triptófano, como el péptido Magainin 2, GIGKWLHSAKKFGKAFVGEIMNS (SEQ ID NO: 19), que se aisló de la rana con garras africana (Karas et al, *Biochemistry* 2002, 41,10723-31), son CPP adicionales útiles en la presente invención. Además, la indolicidina, ILPWKWPWWPWR (SEQ ID NO: 27), que se aisló de neutrófilos bovinos, es otro CPP útil en la presente invención. Estos y otros péptidos de secuencia y propiedades similares son reconocidos por un experto en la técnica como alternativas funcionales y están abarcados por la presente invención. Además, estos péptidos pueden modificarse para mejorar la función según se desee o sea necesario.

La síntesis de péptidos y polinucleótidos a granel puede ser realizada por fabricantes contratados, como Neo Group, Inc. (Cambridge, MA) usando metodologías estándar que incluyen la síntesis de protección/desprotección de sólido-supercóntigo a través de sintetizadores de alta fidelidad. El componente péptido-PNA o péptido-ADN es la molécula terapéutica que se introduce en el patógeno y altera su regulación genética.

En una realización, una molécula antisentido se conjuga con un CPP usando métodos de conjugación bien conocidos que emplean química de acoplamiento de succinimidil-6-hidrazinonicotinatoacetonehidrazona a succinimidil-4-formilbenzoato. Este es un método de conjugación específico, de buen comportamiento y muy eficaz para el acoplamiento péptido-ADN. Para acoplar covalentemente péptidos a ácidos nucleicos, los péptidos se preparan para la reacción modificando el extremo N-terminal con un grupo reactivo. En una realización, el extremo N-terminal del péptido se modifica con S6H (succinimidil-6-hidrazinonicotinatoacetonehidrazona). Los péptidos N-protectados se desalan y se disuelven en DMF seco. Luego, se añade S6H en excesos 2x molares a una solución en agitación y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. El tratamiento sigue procedimientos conocidos en la técnica, como el descrito por Dirksen et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2006 128, 15602-3. Pueden usarse otros métodos de acoplamiento de péptidos a ácidos nucleicos conocidos en la técnica.

Puede utilizarse un ensayo FITC para controlar la captación celular de péptidos. Los péptidos se conjugaron con isotiocianato de fluoresceína (FITC) para monitorizar la captación usando microscopía de fluorescencia. La FIG. 2A-2B muestra los resultados del ensayo para varios péptidos probados en MRSA (FIG. 2A) y AcB (FIG. 2B) (superposiciones fluorescentes 2 horas después del tratamiento con 1  $\mu$ M de agentes FITC-péptido, barra de escala = 100  $\mu$ m). Para MRSA, los péptidos catiónicos helicoidales con motivos KFF y RFF son eficaces para la entrada celular. Además, Magainin-FITC es eficaz para entrar en MRSA. No parece haber ningún efecto bactericida de los péptidos a la concentración probada (1  $\mu$ M) en ninguna de las micrografías presentadas en la FIG 2A-2B.

En otra realización de la invención, la molécula antisentido se combina con un polímero de administración. La plataforma de administración de fármacos de nanopartículas a base de polímeros se adapta a un conjunto diverso de modalidades terapéuticas de polinucleótidos. En un aspecto de la invención, el polímero de administración es catiónico. En otro aspecto de la invención, el polímero de administración comprende iones de fosfonio y/o iones de amonio. En otro ejemplo de la invención, la molécula antisentido se combina con un polímero de administración y la composición forma nanopartículas en solución. En una realización adicional, los políplexos de nanopartículas son estables en suero y tienen un tamaño en el intervalo de aproximadamente 30 nm-5000 nm de diámetro. En una realización, las partículas tienen un diámetro inferior a aproximadamente 300 nm. Por ejemplo, las nanopartículas tienen menos de aproximadamente 150 nm de diámetro.

En una realización, el vehículo de administración comprende un copolímero de bloque catiónico que comprende grupos iónicos de fosfonio o amonio como se describe en el PCT/US12/42974. En una realización, el polímero es *poli*[(etilenglicol)<sub>9</sub> metil etil metacralato][estirilfosfonio] de dibloques. En otra realización de la invención, el polímero de administración comprende glicoamidoaminas como se describe en Tranter et al. Amer Soc Gene Cell Ther, diciembre de 2011; polihidroxilamidoaminas, macromoléculas dendríticas, poliésteres que contienen carbohidratos, como se describe en la US20090105115; y la US20090124534. En otras realizaciones de la invención, el vehículo de administración de ácidos nucleicos comprende un polipéptido catiónico o un lípido catiónico. Un ejemplo de polipéptido catiónico es la polilisina. Ver Patente de Estados Unidos 5.521.291.

En una realización, las moléculas antisentido son parte de una composición que comprende polímeros de administración o portadores. En otra realización, las moléculas antisentido son parte de poliplexos de nanopartículas capaces de transportar moléculas antisentido con estabilidad en suero. Las composiciones de poliplexos comprenden un polímero de administración sintético (polímero portador) y un compuesto biológicamente activo asociados entre sí en forma de partículas que tienen un diámetro medio de menos de aproximadamente 500 nm, como aproximadamente 300 nm, o aproximadamente 200 nm, preferiblemente menos de aproximadamente 150 nm, como menos de aproximadamente 100 nm. La invención abarca partículas en el intervalo de aproximadamente 40 nm - 500 nm de diámetro.

En una realización, el polímero de administración o portador comprende un copolímero de bloque catiónico que contiene grupos iónicos de fosfonio o amonio como se describe en el PCT/US12/42974. En otra realización de la invención, el polímero de administración o portador comprende glicoamidoaminas como se describe en Tranter et al. Amer Soc Gene Cell Ther, diciembre de 2011; polihidroxilamidoaminas, macromoléculas dendríticas, poliésteres que contienen carbohidratos, como se describe en la US20090105115; y la US20090124534. El sistema de polímero de poliglicoamidoamina (PGAA), que es un sistema de nanopartículas localizado y biodegradable patentado representa otro polímero de administración o portador. La poli(galactaramidoamina) es un vehículo polimérico catiónico eficaz con baja citotoxicidad (Wongrakpanich et al. Pharmaceutical Development and Technology, 12 de enero de 2012). El sistema de administración de nanopartículas divulgado en Hemp et al. Biomacromolecules, 2012 13:2439-45 representa otro polímero de administración o portador útil en la presente invención.

En otras realizaciones de la invención, el polímero de administración o portador comprende un polipéptido catiónico o un lípido catiónico. Los polímeros, como *poli*-L-lisina (PLL), polietilimina (PEI), quitosano y sus derivados también están abarcados por la invención. La administración de ácido nucleico usando estos compuestos se basa en la formación de complejos impulsada por interacciones electrostáticas entre el gen y el agente de administración policatiónico. Los complejos de polímero-ADN se condensan en partículas del orden de 60 nm - 120 nm de diámetro. Los polímeros como el PEI y el PLL lineales tienen altas tasas de transfección en una variedad de células.

La administración de ácidos nucleicos *in vivo* tiene limitaciones de tamaño que requieren un poliplexo suficientemente pequeño para permitir tiempos de circulación prolongados y captación celular. Además, los poliplexos deben resistir la agregación inducida por sales y suero. La estabilidad del suero se asocia generalmente con un tamaño de partícula de aproximadamente menos de 150 nm de radio hidrodinámico o menos que pueda mantenerse durante 24 h. Las nanopartículas de la invención, que comprenden polímero terapéutico y de administración de ácidos nucleicos, tienen el radio hidrodinámico y las propiedades del material para la estabilidad en suero. En particular, el polímero de administración, cuando se combina con el ácido nucleico, protege la carga terapéutica en condiciones fisiológicas. Los polímeros de administración están diseñados para tener características de autoensamblaje espontáneo en nanopartículas cuando se combinan con polinucleótidos en solución.

La invención también contempla otros polímeros de administración que forman nanopartículas estables en suero. La invención no se limita al tipo de polímero de administración y puede adaptarse a las características del ácido nucleico como longitud, composición, carga y presencia de péptido acoplado. El polímero de administración también puede adaptarse a las propiedades del material de la nanopartícula resultante como el radio hidrodinámico, la estabilidad en el torrente sanguíneo del huésped, la toxicidad para el huésped y la capacidad de liberar carga dentro de una célula huésped.

En una realización, la molécula antisentido o su conjugado peptídico de penetración se administra en forma de sal. La sal puede ser cualquier sal farmacéuticamente aceptable que comprenda una sal de adición de ácido o de base. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables con ácidos incluyen las formadas con ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido yodhídrico, ácido fluorhídrico, ácido fosforoso y similares. También se incluyen las sales que se forman con ácidos orgánicos como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos fenilsustituídos, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos alcanodioicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, etc. e incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. Las sales ejemplares incluyen, por tanto, sulfatos, piro-sulfatos, bisulfatos, sulfitos, bisulfitos, nitratos, fosfatos,

5 monohidrogenofosfatos, dihidrogenofosfatos, metafosfatos, pirofosfatos, cloruros, bromuros, yoduros, acetatos, trifluoroacetatos, propionatos, caprilatos, isobutiratos, oxalatos, malonatos, suberatos de succinato, sebacatos, fumaratos, maleatos, mandelatos, benzoatos, clorobenzoatos, metilbenzoatos, dinitrobenzoatos, ftalatos, bencenosulfonatos, toluensulfonatos, fenilacetatos, citratos, lactatos, malatos, tartratos, metanosulfonatos y similares. También se contemplan sales de aminoácidos, como arginatos, gluconatos y galacturonatos (ver, por ejemplo Berge S. M. et al., "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Science, 66:1-19 (1997). Pueden prepararse sales de adición de ácido de moléculas antisentido básicas poniendo en contacto las formas de base libre con una cantidad suficiente del ácido deseado para producir la sal de acuerdo con métodos y técnicas con las que esté familiarizado un experto en la técnica.

10 Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables se forman mediante la adición de una base inorgánica o una base orgánica al ácido libre. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables se pueden formar con metales o aminas, como metales alcalinos y alcalinotérreos o aminas orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, pero no están limitadas a, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero no están limitadas a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, dietanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, N,N-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, etilendianilina, N-metilglucamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares.

25 Las moléculas antisentido se administran como parte de una composición farmacéutica que comprende un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. Los diluyentes, excipientes y portadores adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gernaro Ed., 1985). Las formas de dosificación farmacéuticas adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo que están adaptados para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables o infusibles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación final debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un disolvente o un medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, solución salina, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos, y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

40 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando la molécula antisentido en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, como se requiera, seguido de esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y las técnicas de secado por congelación, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado presente en las soluciones previamente filtradas estériles.

50 La invención también proporciona moléculas y composiciones antisentido para su uso en el tratamiento de una infección por *Staphylococcus aureus* y un método *in vitro* para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. En una realización, el *Staphylococcus aureus* es una cepa resistente a meticilina (MRSA). En una realización, el animal que se somete a tratamiento para una infección por *Staphylococcus aureus* muestra uno o más síntomas de infección por *Staphylococcus aureus* que incluyen producción de pus en el área infectada, forúnculos, abscesos, ántrax, orzuelos y/o celulitis. El animal también puede mostrar signos de sepsis o neumonía.

55 En una realización, las moléculas antisentido se administran mediante inyección intravenosa, intramuscular o peritoneal. En otra realización, las moléculas antisentido se administran tópicamente, por ejemplo, a un tejido que se sospecha que está infectado por *Staphylococcus aureus*. En otra realización, las moléculas antisentido se administran por vía oral. Cuando se administran por vía oral, las moléculas antisentido pueden formularse como parte de una composición farmacéutica recubierta con un recubrimiento entérico que protegerá las moléculas antisentido del entorno ácido del estómago y liberará las moléculas antisentido en el tracto gastrointestinal superior. En otra realización, las moléculas antisentido pueden formularse como parte de una formulación de liberación sostenida que liberará las moléculas antisentido de manera sustancialmente continua durante un período de tiempo.

65 Los animales que pueden tratarse con las moléculas antisentido de acuerdo con la invención incluyen

cualquier animal que pueda beneficiarse del tratamiento con las moléculas antisentido. Dichos animales incluyen mamíferos como humanos, perros, gatos, ganado, caballos, cerdos, ovejas, cabras y similares.

5 Las moléculas antisentido se administran en una cantidad que es eficaz para el tratamiento de una infección por *Staphylococcus aureus* o la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*. La cantidad puede variar ampliamente dependiendo del modo de administración, la edad del animal, el peso del animal y el área de superficie del mamífero. La cantidad de molécula antisentido, conjugado, sal y/o complejo de los mismos puede variar de 1 pmol/kg a 1 mmol/kg. En otra realización, la cantidad puede variar de 1 nmol/kg a 10 mmol/kg. Cuando se administra por vía tópica, la cantidad de molécula antisentido, conjugado, sal y/o complejo de los mismos puede variar del 1 al 99 por ciento en peso. En otra realización, la cantidad de molécula antisentido, conjugado, sal y/o complejo de los mismos puede variar del 1 al 10 por ciento en peso.

#### EJEMPLO I

15 **Síntesis del conjugado péptido-PNA:** Todos los agentes PNA se prepararon usando técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida heterogéneas y se purificaron por HPLC.

20 Aunque se ha usado la dosificación directa con polinucleótidos desnudos para inhibir la patogénesis de MRSA en cultivo, una barrera importante para la terapia con ácidos nucleicos en humanos es la pared celular bacteriana. Para superar la barrera de la pared celular, los péptidos derivados de organismos que infectan bacterias que pueden penetrar estas paredes celulares bacterianas pueden unirse a ácidos nucleicos o ácidos nucleicos modificados para mejorar la entrada de ácidos nucleicos en la bacteria.

25 Las secuencias de ADN se sintetizaron usando sintetizadores de alta fidelidad elaborados por NEO-Bio Group, Cambridge, MA. Luego, el polinucleótido se acopló a péptidos que permiten la penetración de membranas bacterianas y la entrada de polinucleótidos. En la presente invención, se empleó una metodología sintética en fase sólida para el acoplamiento péptido-ADN donde la cisteína sirvió como conector entre el péptido y el ADN.

30 En una realización específica, se sintetizaron análogos de PNA y ADN de 15-mer antisentido para probar en cultivo celular. Un control positivo de la literatura (FmhB); y también se sintetizó una secuencia no codificante para su uso como control negativo (NC). Cada polinucleótido se acopló al motivo de péptido de penetración celular (CPP) KFFKFFKFFK (SEQ ID NO: 17).

35 Se sintetizaron y probaron candidatos tanto de PNA-CPP como de ADN-CPP. Se realizó un análisis espectrométrico de masas de cada conjugado para confirmar la síntesis exitosa. La pureza de los candidatos de PNA-péptido y ADN-péptido se estableció usando HPLC. Se logró una pureza de aproximadamente el 99,9% para el PNA-péptido; mientras que se logró >87% para ADN-péptido. Los ADN-péptidos produjeron un mayor grado de impureza probablemente debido a los pasos requeridos para elaborar el péptido de ADN y CPP por separado y luego conjugarlos antes de un paso de purificación final. Por el contrario, la síntesis de los agentes de PNA produjo niveles de pureza de aproximadamente el 99%. El aumento de la pureza y la simplicidad de fabricación de terapéuticos de PNA-péptido proporciona ventajas sobre los candidatos de ADN-péptido con respecto a la fabricación compatible con cGMP en campos de acción.

#### EJEMPLO II

45 Se utilizó un ensayo FITC para monitorizar la captación celular de péptidos. Los péptidos se conjugaron con isotiocianato de fluoresceína (FITC) para monitorizar la captación usando microscopía de fluorescencia. La FIG. 2A-2B muestra los resultados del ensayo para varios péptidos probados en MRSA (FIG. 2A) y AcB (FIG. 2B) (superposiciones fluorescentes 2 horas después del tratamiento con 1  $\mu$ M de agentes de FITC-péptido, barra de escala = 100  $\mu$ m). Para MRSA, los péptidos catiónicos helicoidales con motivos KFF y RFF son eficaces para la entrada celular. También, Magainin-FITC es eficaz para entrar en MRSA. No parece haber ningún efecto bactericida de los péptidos a la concentración probada (1  $\mu$ M) en ninguna de las micrografías presentadas en la FIG 2A-2B.

#### EJEMPLO III

55 **Estudios de MRSA *in vitro*:** La demostración de los efectos específicos de secuencia de las moléculas de PNA-péptido sobre MRSA se llevó a cabo en MRSA USA 300. MRSA USA 300 es una fuente principal de infecciones adquiridas en la comunidad en los Estados Unidos, Canadá y Europa. El clon FPR3757 es una cepa USA 300 resistente a múltiples fármacos que está disponible en ATCC tanto como cultivo (ATCC® BAA-1556TM) como ADN genómico (ATCC® BAA-1556D-5). La cepa MRSA USA 300 está bien caracterizada, lo que permite una evaluación comparativa confiable. Las curvas de crecimiento de MRSA se generaron inoculando reservas bacterianas congeladas recién descongeladas a diferentes diluciones que varían de 1:3000, 1:1500, 1:600 y 1:300 en caldo de soja tréptico (TSB, Becton-Dickinson). Las lecturas de absorbancia se toman cada hora a 600 nm ( $A_{600}$ ) y 550 nm ( $A_{550}$ ) usando un espectrofotómetro Biomate 3S (Thermo Scientific) para establecer los ajustes de medición óptimos y caracterizar la cinética del crecimiento bacteriano. Las lecturas a 550 nm dan una sensibilidad ligeramente

mayor. Se observa una correlación con las valoraciones de dilución más bajas y un tiempo más rápido para un valor de absorbancia más alto. A550 se establece como la medición óptima para evaluar la propagación en los ensayos de titulación de vancomicina y concentración inhibitoria mínima (MIC).

5 Se establecieron titulaciones de vancomicina para determinar un intervalo de prueba adecuado. Una solución madre de 800 µg/ml se diluyó diez veces en TSB a 80 µg/ml y se diluyó en serie adicional a 40, 20, 10, 5 y 2,5 µg/ml en TSB, respectivamente. La cepa MRSA USA 300 se cultivó hasta un valor de DO 550 de fase logarítmica inicial de 0,111 y se trató con el intervalo de 80-2,5 µg/ml de vancomicina. Se realizaron mediciones de absorbancia a 550 nm cada hora durante un período de tiempo de 4 horas.

10 Se realizaron análisis de concentración inhibitoria mínima (MIC) como se describe en Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 7ª ed.; Approved Standard M7-A7; CLSI: Wayne, PA, USA, 2006; volumen 26, N° 2. Se usaron vancomicina y metilicina como controles. La MIC se determinó como la concentración más baja de agente que inhibe el crecimiento bacteriano detectada en A<sub>600</sub>.

15 Los análisis de tiempo-muerte se realizaron como se describe en Haste et al. J. Antibiot. 2010, 63, 219-224. Se tomaron alícuotas de agentes a varias concentraciones en los tubos Falcon. Se añadieron a los tubos cuatro ml de bacterias a 5E5 cfu/ml. Los tubos se incubaron en un agitador a 37° C, y a las 0, 2, 4 y 8 h se analizaron posteriormente para determinar el crecimiento bacteriano a través de A<sub>600</sub>.

20 Efectos específicos de secuencia de agentes de polinucleótidos-péptidos contra MRSA: Se probó una amplia variedad de concentraciones para las secuencias antisentido de PNA-péptido determinadas a partir de bioinformática. Se usó FmhB como control positivo de la literatura (Xie et al., Molecular Therapy, 2004, 10, 652-659) y se usó una secuencia no codificante con un motivo terminal (KFF)<sub>3</sub>K como control negativo (NC) para indicar los efectos bactericidas impartidos por la alteración de la membrana del péptido. La inhibición específica de secuencia se demostró tratando bacterias durante la fase de retraso para determinar la inhibición del crecimiento y la recuperación potencial en puntos temporales posteriores. Los agentes candidatos y el control de secuencia no codificante se diluyeron en un intervalo de 20 µM, 5 µM, 1 µM, 250 µM y 25 µM con agua estéril libre de ARNasa y libre de ADNasa. Se observó inhibición del crecimiento de MRSA en un amplio intervalo de concentraciones de ONA-péptido.

25 El transcurso del tiempo se llevó a cabo usando la cepa USA 300 de MRSA. Se añade MRSA recién descongelada a una dilución de 1:100 en TSB a los pocillos que contienen las moléculas de PNA-péptido individuales. También se ensayaron un control positivo adicional, vancomicina a 12,5 µg/ml, y un control negativo, solo agua. Las muestras se dejaron incubar a 37° C con agitación orbital a 225 RPM y se midieron a intervalos de tiempo de dos horas, durante un transcurso de tiempo de 8 horas. Se observó inhibición del crecimiento de MRSA a lo largo del tiempo a una concentración de 5 µM.

35 En el crecimiento en fase logarítmica, se observó inhibición a concentraciones tan bajas como ~1 µM para conjugados de PNA-péptido y tan bajas como ~10 µM para conjugados de ADN-péptido.

40 Cuando los péptidos de penetración celular se conjugaron con FITC y se añadieron a las células en cultivo, las células permanecieron vivas durante períodos de tiempo de los experimentos de cultivo celular.

#### 45 EJEMPLO IV

50 Para disolver los conjugados ADN-péptido, se dispersaron en tampón tris a un pH elevado=9. Luego, los conjugados se agitaron suavemente durante 24 h a 40°C. Después de este período de tiempo todavía se observó turbiedad, por lo que los conjugados se calentaron a 80° C con agitación suave durante 6 h más, después de lo cual se obtuvieron soluciones transparentes. La solución inicial se prueba a través de DLS para buscar un posible autoensamblaje entre los conjugados ADN-péptido. Como se muestra con muchos polímeros cargados, se observó autoagregación en solución, mostrando amplios agregados polidispersos en el intervalo de 300 nm a 1 micra.

55 El tamaño de las partículas desempeña un papel importante en la determinación del tiempo de circulación sanguínea y la depuración. También es un predictor de la permeación tisular, el potencial de depuración y la selectividad. Las partículas que contienen polímeros se han validado con ARNip y ADN, son capaces de proteger los ácidos nucleicos de la degradación de las nucleasas y pueden modificarse para lograr estabilidad coloidal en el torrente sanguíneo. Los conjugados molécula antisentido-péptido de la presente invención se combinaron con copolímeros de bloque de fosfonio estables en suero para formar poliplexos. Este copolímero dibloque forma un ensamblaje supramolecular con ADN cargado negativamente. La partícula forma una morfología de tipo núcleo-cubierta con un cepillo neutro de polietilenglicol (PEG) en la superficie. El diámetro hidrodinámico del poliplexo se mide en un instrumento de dispersión de luz dinámica (DLS) Zetasizer (Nano ZS) (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Como comparación de tamaño, se midió un conjugado ADN-péptido sin polímero portador a 1 mg/ml en solución tampón tris a pH=9. Este conjugado ADN-péptido con *poli*[(etilenglicol)<sub>9</sub> metil etil

metacralato][estirilfosfonio] dibloque a tres concentraciones mostró intervalos de tamaño de 40 nm - 300 nm.

La formación de nanopartículas con los conjugados ADN-péptido dependía de factores físicos. Como la región de ADN está cargada negativamente y la región KFFKFFKFFK (SEQ ID NO: 17) está cargada positivamente, los conjugados muestran fuertes asociaciones intramoleculares en solución. Se evaluó una amplia variedad de condiciones de formulación. Las partículas óptimas se forman en proporciones de carga a carga de 2-4(fosfonio +/fosfato de ADN-) y [conjugado ADN-péptido]  $\leq 0,5$  mg/ml e inferiores. Cuando las concentraciones excedieron los 0,5 mg/ml, el análisis de dispersión dinámica de luz (DLS) indicó que se formaron agregados grandes. Los datos de DLS indican que la concentración de la pre-formulación influye en el intervalo de tamaño de nanopartículas final, con 0,5 mg/ml formando las nanopartículas más grandes agrupadas alrededor de 90 nm-100 nm; y 0,1 mg/ml formando partículas tan pequeñas como 40 nm de diámetro.

Para disolver los conjugados ADN-péptido, se dispersaron en tampón tris a un pH elevado =9. Luego, los conjugados se agitaron suavemente durante 24 h a 40°C. Después de este período de tiempo todavía se observa turbiedad, por lo que los conjugados se calentaron a 80° C con agitación suave durante 6 h más, después de lo cual se obtienen soluciones transparentes. La solución inicial se probó mediante DLS para buscar un posible autoensamblaje entre los conjugados ADN-péptido. Como se mostró con muchos polímeros cargados, se observó autoagregación en solución, mostrando agregados polidispersos amplios en el intervalo de 300 nm a 1  $\mu$ m.

#### EJEMPLO V

Para evaluar la seguridad del antibiótico antisentido de PNA-péptido, se realizó un estudio de tolerabilidad de dosis única en ratones. Como se muestra en la FIG. 4, los ratones se dividieron en cuatro grupos de 15 animales por grupo. A cada grupo se le administró una única inyección intravenosa de control de vehículo (PBS) o antibiótico antisentido de PNA-péptido a una dosis de 1 mg/kg, 3,3 mg/kg o 10 mg/kg.

Después de las inyecciones, se recogieron suero y tejidos como se indica en la FIG. 4. Las muestras se recogieron 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 4 horas y 12 horas después de la administración del antibiótico antisentido de PNA-péptido. Estas muestras pueden evaluarse para marcadores de seguridad biológica y análisis de biodistribución de antibióticos antisentido de PNA-péptido.

Se observaron los animales para signos externos de toxicidad después de las inyecciones. Todos los animales sobrevivieron a los tratamientos y no mostraron signos externos de toxicidad. Estos resultados indican que el antibiótico antisentido de PNA-péptido es seguro *in vivo* cuando se administra en una única dosis tan alta como 10 mg/kg.

#### EJEMPLO VI

Para evaluar adicionalmente la seguridad del antibiótico antisentido de PNA-péptido, se realizaron estudios de seguridad de múltiples dosis en ratones. Los ratones se dividieron en cuatro grupos de 10 animales por grupo. A cada grupo se le administraron múltiples inyecciones intravenosas de control de vehículo (PBS) o antibiótico antisentido de PNA-péptido de acuerdo con el programa de dosificación que se muestra en la FIG. 5.

Después de las inyecciones, se monitorizó a los animales para detectar signos externos de toxicidad, como peso corporal, apetito y aseo. Dependiendo del grupo de tratamiento, los animales se sacrificaron después de tres, cuatro o siete días y se recogieron muestras de sangre para medir marcadores biológicos hepáticos y renales (FIG. 5).

No se observó mortalidad en ningún grupo de tratamiento. Todos los animales mostraron un comportamiento normal de apetito y aseo. Además, no se observaron cambios significativos en el peso corporal para ningún grupo de tratamiento (FIG. 6). Los marcadores hepáticos (ALT, ALP, AST, CPK) y renales (BUN) parecían normales en todos los grupos de tratamiento. Estos resultados indican que el antibiótico antisentido de PNA-péptido es seguro *in vivo* cuando se administra en múltiples dosis de hasta 10 mg/kg.

#### EJEMPLO VII

Para evaluar la eficacia *in vivo* del antibiótico antisentido de PNA-péptido, se desarrolló un modelo de ratón con infección sanguínea por *Staphylococcus aureus*. La FIG. 7 muestra los datos de supervivencia para ratones a los que se les administraron dosis crecientes de *S. aureus* resistente a *metilicina* (MRSA). A los ratones se les administró o bien un control de vehículo (4% de mucina gástrica hog) o  $4 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^7$ , o  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (CFU) de MRSA. Como se muestra en la FIG. 7, El LD<sub>50</sub> en este modelo de ratón fue de aproximadamente  $2 \times 10^7$  CFU.

Después de establecer el modelo de ratón de infección sanguínea, se evaluó la eficacia del antibiótico antisentido de PNA-péptido. Los ratones se dividieron en tres grupos de 10 animales por grupo. A cada grupo se le

inyectó por vía intravenosa MRSA en un volumen de 0,2 ml a una concentración de  $2 \times 10^7$  CFU/ml. Luego, cada grupo se trató con (i) control de vehículo (PBS); (ii) antibiótico antisentido de péptido-PNA a una dosis de 10 mg/kg; o (iii) vancomicina (2 mg/kg), que sirvió como control positivo. Se administraron tratamientos con antibióticos antisentido de PNA-péptido dos veces al día durante cuatro días.

5

La FIG. 8 muestra la carga bacteriana en la sangre del ratón 24 horas después del tratamiento. Como se muestra en la FIG. 8, el tratamiento con el antibiótico antisentido de PNA-péptido redujo los niveles de MRSA en sangre en comparación con el grupo de control. Estos resultados indican que el antibiótico antisentido de PNA-péptido es eficaz *in vivo*.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

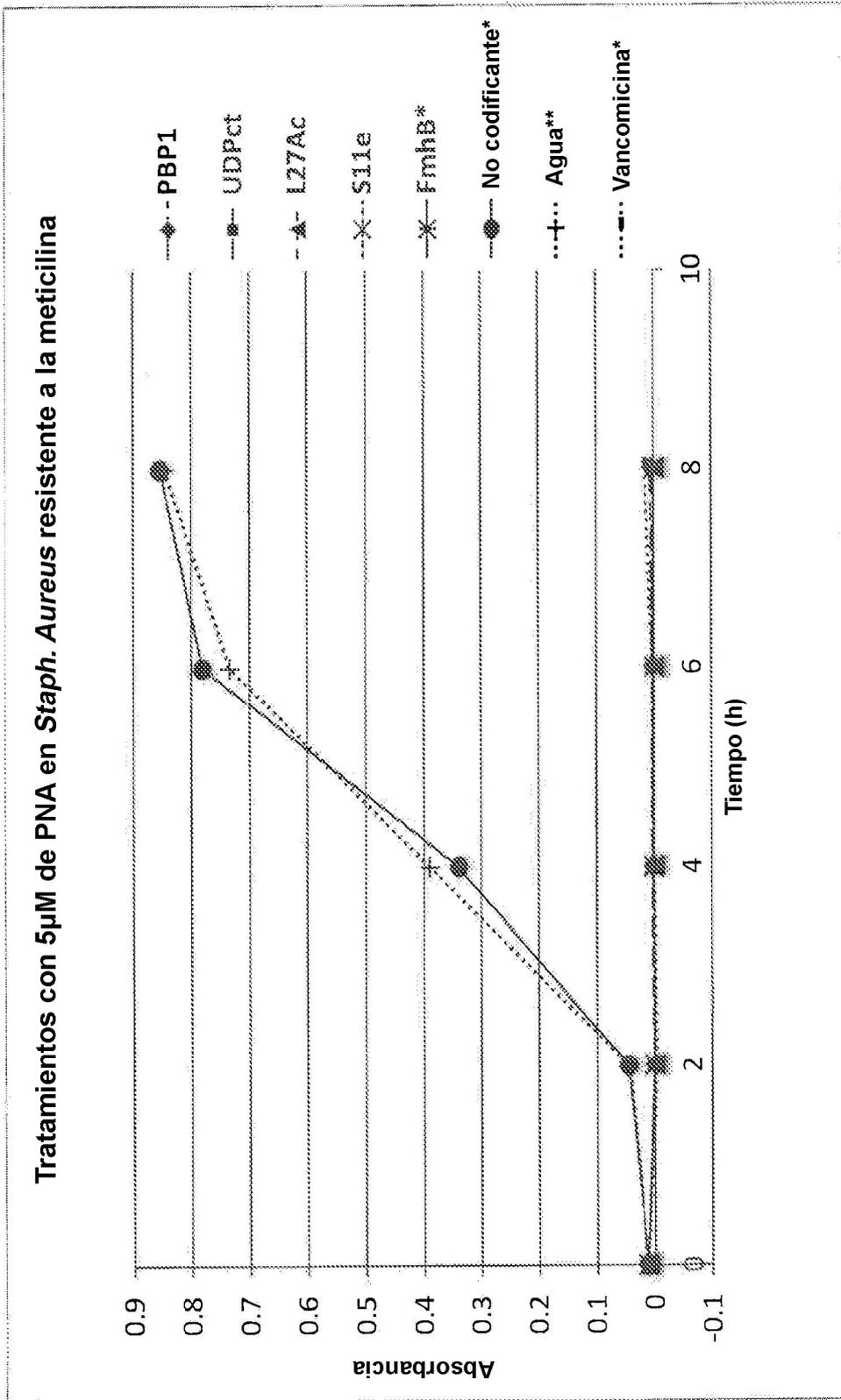
- 5 **1.** Una molécula antisentido o una sal de la misma que inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* que comprende una secuencia de polinucleótidos que es antisentido a la región codificante de la transpeptidasa-transglicosilasa/proteína de unión a penicilina 1A/1B (PBP1) multimodular de *Staphylococcus aureus* híbrida con dicha región codificante en condiciones fisiológicas, en donde dicha molécula antisentido tiene una longitud de 10 a 50 nucleobases y tiene una secuencia que es por lo menos un 80% idéntica a una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 5, y en donde dicha molécula antisentido está conjugada con una molécula de penetración celular.
- 10 **2.** La molécula antisentido de la reivindicación 1, en donde dicha molécula antisentido es totalmente complementaria a una región codificante de la transpeptidasa-transglicosilasa/proteína de unión a penicilina 1A/1B (PBP1) multimodular de *Staphylococcus aureus*.
- 15 **3.** La molécula antisentido de la reivindicación 1 o 2, que tiene una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 5.
- 4.** La molécula antisentido de la reivindicación 3, en donde la secuencia es la SEQ ID NO: 1.
- 20 **5.** La molécula antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es un oligonucleótido.
- 6.** La molécula antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que es sustancialmente pura.
- 25 **7.** La molécula antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la molécula antisentido comprende una estructura principal modificada.
- 8.** La molécula antisentido de la reivindicación 7, en donde la estructura principal modificada es una estructura principal de PNA.
- 30 **9.** La molécula antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicha molécula de penetración celular es un péptido.
- 10.** Una composición que comprende una molécula antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que forma complejos con un polímero de administración.
- 35 **11.** La composición de la reivindicación 10, en donde dicho polímero de administración es un copolímero de bloque catiónico que comprende grupos iónicos de fosfonio o amonio.
- 40 **12.** Un método *in vitro* para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, que comprende administrar una cantidad eficaz de una molécula antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o composición de las reivindicaciones 10-11 a un tejido que contiene dicho *Staphylococcus aureus* o que se sospecha que contiene *Staphylococcus aureus*.
- 45 **13.** La molécula antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la composición de las reivindicaciones 10-11 para su uso en el tratamiento de una infección por *Staphylococcus aureus*.
- 14.** La molécula antisentido o la composición para el uso de la reivindicación 13, en donde la molécula antisentido o la composición es para administración tópica.

50

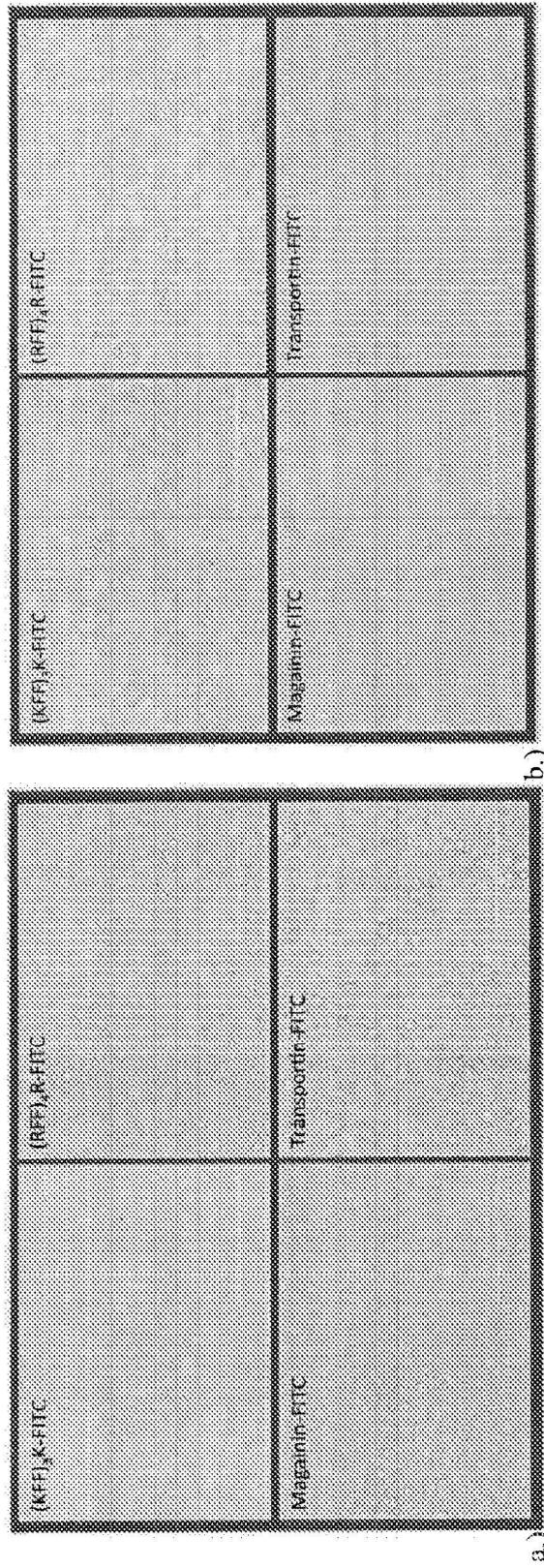
55

60

65



**FIGURA 1**



**FIGURAS 2A - 2B**

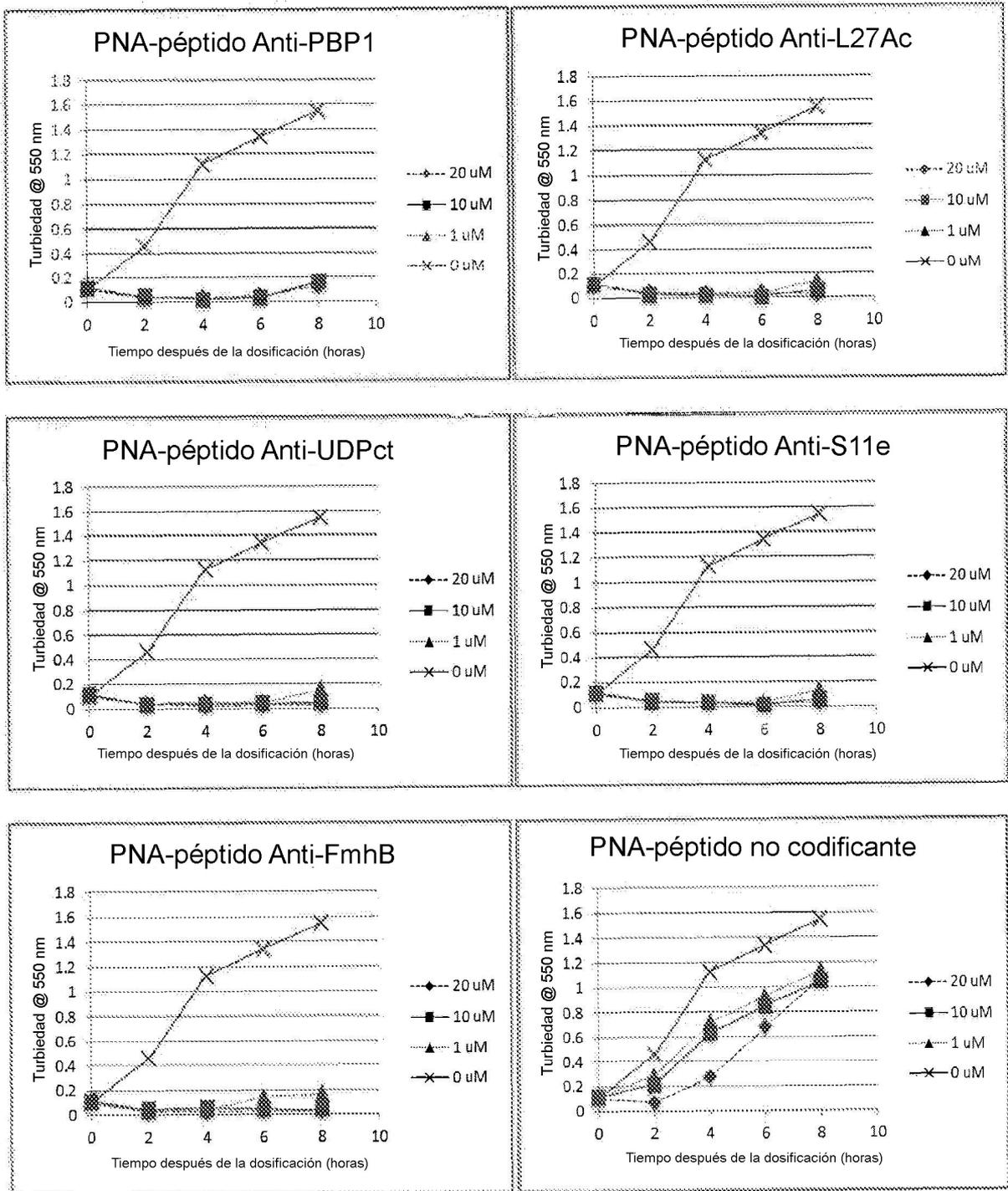


FIGURA 3

Nº de grupo	N	Agente	Nivel de dosis (mg/kg)	Volumen	Vía de Admin.	Programa de Dosificación	Tiempos de sangrado terminal (para suero)	Recogida de tejido
1	15	Vehículo (PBS)	N/A	0.2 ml	IV	qd x 1	3 ratones/grupo:	Recoger hígado, riñón, pulmón y bazo; congelar al instante y almacenar a -80° C
2	15	PNA-péptido Anti-PBPI	1	0.2 ml	IV	qd x 1	* 15 min.	
3	15	PNA-péptido Anti-PBPI	3.3	0.2 ml	IV	qd x 1	* 30 min. * 1 hr.	
4	15	PNA-péptido Anti-PBPI	10	0.2 ml	IV	qd x 1	* 4 hr. * 12 hr.	

Sangrado terminal 3 ratones/grupo/punto temporal a 15 min, 30 min, 1 hr, 4 hr1 y 12 hr.

**FIGURA 4**

Nº de Grupo	N	Agente	Nivel de dosis (mg/kg)	Volumen	Vía de Admin.	Programa de dosificación
1	10	Vehículo (PBS)	N/A	0.2 ml	IV	qd x 7
2	10	PNA-péptido Anti-PBPI	10	0.2 ml	IV	qd x 7
3	10	PNA-péptido Anti-PBPI	10	0.2 ml	IV	q2d x 4
4	10	PNA-péptido Anti-PBPI	10	0.2 ml	IV	q3d x 3

FIGURA 5

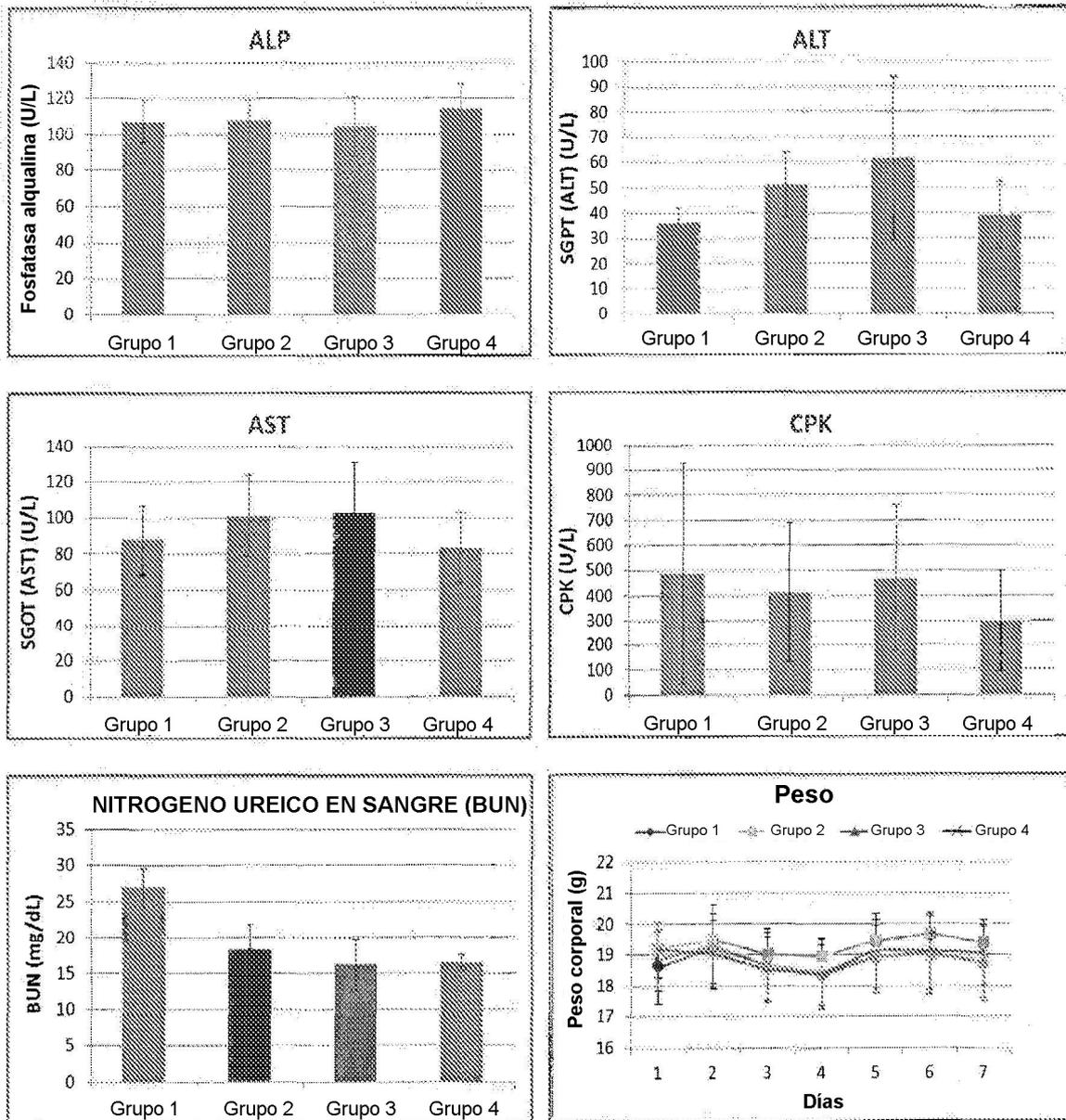
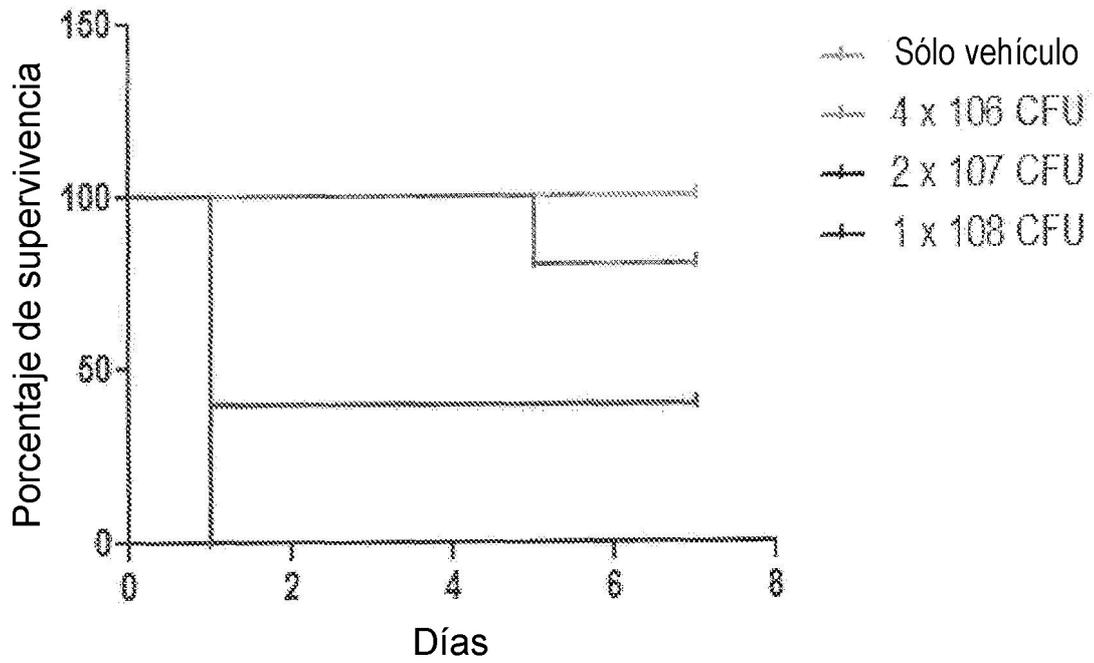


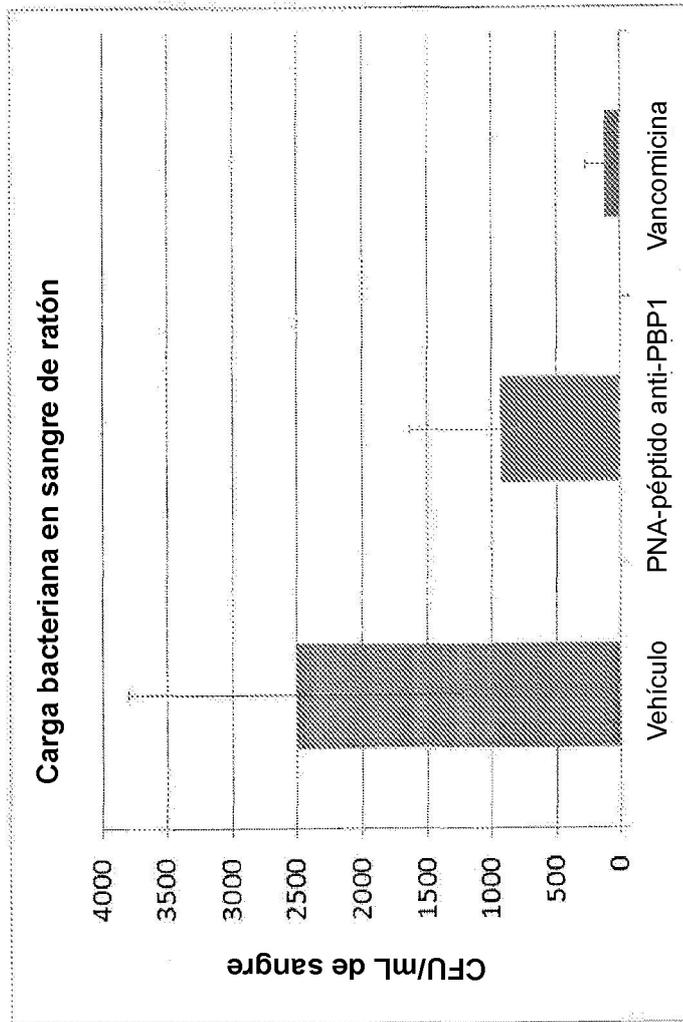
FIGURA 6

### Desarrollo de Modelo de Ratón de Infección Sanguínea



**FIGURA 7**

Nº de grupo	N	MRSA			Tratamiento				
		Dosis ( $2 \times 10^7$ CFU/mL)	Volumen (mL)	Vía	Agente	Dosis (mg/kg)	Volumen (mL)	Vía	Programa de dosis
1	10	$4 \times 10^8$	0.2	IV	Vehículo (PBS)	10	0.2	IV	b.i.d X 4
2	10	$4 \times 10^8$	0.2	IV	PNA-péptido Anti-PBP1	10	0.2	IV	b.i.d. X 4
3	10	$4 \times 10^8$	0.2	IV	Vancomicina	2	0.2	IV	b.i.d. X 4



**FIGURA 8**