



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 38 695 T2** 2009.05.28

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 238 071 B1**  
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 38 695.3**  
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/42391**  
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 992 550.4**  
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/042457**  
(86) PCT-Anmeldetag: **29.11.2000**  
(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **14.06.2001**  
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.09.2002**  
(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **23.04.2008**  
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.05.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/11 (2006.01)**  
**A61K 31/7125 (2006.01)**  
**A61P 31/04 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:  
**168150 P**      **29.11.1999**      **US**

(73) Patentinhaber:  
**Avi Biopharma, Inc., Corvallis, Oreg., US**

(74) Vertreter:  
**Vossius & Partner, 81675 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:  
**IVERSEN, Patrick L., Corvallis, OR 97330, US**

(54) Bezeichnung: **GEGEN BAKTERIELLE 16S UND 23S RRNAS GERICHTETE UNGELADENE ANTISENSE OLIGONUKLEOTIDE UND DEREN VERWENDUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft Oligonucleotid-Zusammensetzungen, die Antisense-Oligonucleotide zu bakterieller 16S- und 23S-rRNA sind, und die Verwendung solcher Zusammensetzungen für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung einer bakteriellen Infektion in einem Säuger.

- Agrawal, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(4): 1401–5 (1990).  
 Ardhammar, M. et al., J. Biomolecular Structure & Dynamics 17(1): 33–40 (Aug 1999).  
 Attia, S. A. et al., Antisense & Nucleic Acid Drug Dev. 8(3): 207–14 (1998).  
 Bennett, M. R. et al., Circulation 92(7): 1981–1993 (1995).  
 Bonham, M. A. et al., Nucleic Acids Res. 23(7): 1197–1203 (1995).  
 Boudvillain, M. et al., Biochemistry 36(10): 2925–31 (1997).  
 Cross, C. W. et al., Biochemistry 36(14): 4096–107 (.8. Apr, 1997).  
 Dagle, J. M. et al., Nucleic Acids Research 28(10): 2153–7 (.15. Mai, 2000).  
 Ding, D. et al., Nucleic Acids Research 24(2): 354–60 (.15. Jan, 1996).  
 Egholm, M. et al., Nature 365(6446): 566–8 (7. Okt, 1993).  
 Felgner et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987).  
 Gait, M. J.; Jones, A. S. und Walker, R. T., J. Chem. Soc. Perkin I, 1684–86 (1974).  
 Gee, J. E. et al., Antisense & Nucleic Acid Drug Dev. 8: 103–111 (1998).  
 Good, L. und Nielsen, P. E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95: 2073–2076 (1998).  
 Huie, E. M. et al., J. Org. Chem. 57: 4569 (1992).  
 Jones, A. S., MacCross, M. und Walker, R. T., Biochem. Biophys. Acta 365: 365–377 (1973).  
 Lesnikowski, Z. J. et al., Nucleic Acids Research 18(8): 2109–15 (25. Apr, 1990).  
 Matteucci, M., Tetrahedron Lett. 31: 2385–88 (1990).  
 McElroy, E. B. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 4: 1071 (1994).  
 Mertes, M. P. und Coates, E. A., J. Med. Chem. 12: 154–157 (1969).  
 Miller, P. S. et al., in: Antisense Research Applications, Crooke, S. T. und Lebleu, B., Hrsg., CRC Press, Boca Raton, FL, S. 189. (1993).  
 Olgive, K. K. und Cormier, J. F., Tetrahedron Lett 26: 4159–4162 (1986).  
 Rahman, M. A. et al., Antisense Res Dev 1(4): 319–27 (1991).  
 Roughton, A. L. et al., J. Am. Chem. Soc. 117: 7249 (1995).  
 Stein, D. et al., Antisense & Nucleic Acid Drug Dev. 7(3): 151–7 (Jun 1997); siehe auch  
 Summerton, J. et al., Antisense & Nucleic Acid Drug Dev. 7(2): 63–70 (Apr 1997).  
 Toulme, J. J. et al., Biochimie 78(7): 663–73 (1996).  
 Vasseur, J. J. et al., J. Am. Chem. Soc. 114: 4006 (1992).

**[0002]** Derzeit gibt es einige Typen von Antibiotika, die mit einer Vielfalt von antibakteriellen Mechanismen gegen bakterielle Pathogene in Verwendung sind. Beta-Lactam-Antibiotika wie Penicillin und Cephalosporin wirken, um den letzten Schritt in der Peptidglycan-Synthese zu hemmen. Glycopeptid-Antibiotika, einschließlich Vancomycin und Teichoplanin, hemmen sowohl die Transglycosylierung als auch die Transpeptidierung von Muramyl-Pentapeptid, was wiederum mit der Peptidoglycan-Synthese interferiert. Andere gut bekannt Antibiotika schließen die Quinolone, die die bakterielle DNA-Replikation hemmen, Hemmer der bakteriellen RNA-Polymerase wie Rifampin und Hemmer der Enzyme des Wegs für die Produktion von Tetrahydrofolat, einschließlich der Sulfonamide, ein.

**[0003]** Manche Klassen von Antibiotika wirken auf der Ebene der Proteinsynthese. Bemerkenswert unter diesen sind die Aminoglycoside wie Kanamycin und Gentamycin. Diese Verbindungen zielen die bakterielle 30S-Ribosomen-Untereinheit an, was die Assoziierung mit der 50S-Untereinheit verhindert, um funktionelle Ribosomen zu bilden. Tetracycline, eine weitere wichtige Klasse von Antibiotika, zielen auch die 30S-Ribosomen-Untereinheit an, wobei sie durch Verhindern der Ausrichtung von aminoacylierten tRNAs mit dem entsprechenden mRNA-Codon wirken. Makrolide und Lincosamide, eine weitere Klasse von Antibiotika, inhibieren die bakterielle Synthese durch Binden an die 50S-Ribosomen-Untereinheit und Inhibieren der Peptid-Elongierung oder Verhindern der Ribosomen-Translokation.

**[0004]** Trotz beeindruckender Erfolge im Kontrollieren oder Eliminieren von bakteriellen Infektionen durch Antibiotika hat die weitverbreitete Verwendung von Antibiotika sowohl in menschlicher Medizin als auch als Futtermittelzusatz in der Geflügel- und Nutztierproduktion zu einer Arzneistoffresistenz in vielen pathogenen Bakterien geführt. Mechanismen der Antibiotika-Resistenz können eine Vielfalt von Formen annehmen. Einer der Hauptmechanismen der Resistenz gegen beta-Lactame, insbesondere in Gram-negativen Bakterien, ist das Enzym beta-Lactamase, die das Antibiotikum inaktiv macht. In ähnlicher Weise involviert die Resistenz gegen Aminoglycoside oft ein Enzym, das zum Inaktivieren des Antibiotikums in der Lage ist, in diesem Fall durch Zugabe

einer Phosphoryl-, Adenyl- oder Acetylgruppe. Ein aktives Ausströmen der Antibiotika ist ein weiterer Weg, durch den viele Bakterien eine Resistenz entwickeln. Gene, die Ausfluss-Proteine codieren, wie die tetA-, tetG-, tetL- und tetK-Gene für den Tetracyclin-Ausfluss, sind identifiziert worden. Ein bakterielles Ziel kann durch Verändern des Ziels des Arzneistoffs eine Resistenz entwickeln. Zum Beispiel werden die sogenannten Penicillin-Bindungsproteine (PBPs) in vielen beta-Lactam-resistenten Bakterien verändert, um die kritische Antibiotikum-Bindung an das Zielprotein zu inhibieren. Die Resistenz gegen Tetracyclin kann zusätzlich zu einem verstärkten Ausfluss das Auftreten von cytoplasmatischen Proteinen, die zum Konkurrieren mit den Ribosomen um die Bindung an das Antibiotikum in der Lage sind, involvieren. Wo das Antibiotikum wie bei Sulfonamiden durch Inhibieren eines bakteriellen Enzyms wirkt, können Punktmutationen im Zielenzym eine Resistenz verleihen.

**[0005]** Das Auftreten einer Antibiotikum-Resistenz hat in vielen pathogenen Bakterien, die in vielen Fällen eine Resistenz gegen mehrere Arzneistoffe involvieren, das Schreckgespenst einer Prä-Antibiotikum-Ära aufgebracht, in der viele bakterielle Pathogene durch medizinische Intervention einfach unbehandelbar sind. Es gibt zwei Hauptfaktoren, die zu diesem Szenario beitragen könnten. Der erste ist die schnelle Ausbreitung von Resistenz- und Multi-Resistenz-Genen über bakterielle Stämme, Spezies und Gattungen durch konjugative Elemente, wobei die wichtigsten davon selbst-übertragbare Plasmide sind. Der zweite Faktor ist das Fehlen von derzeitigen Forschungsbemühungen, um neue Typen von Antibiotika zu finden, zum Teil aufgrund des wahrgenommenen Zeitaufwands und der Kosten, die benötigt werden, um neue antibiotische Mittel zu finden und sie durch klinische Versuche zu bringen, ein Vorgang, der in manchen Fällen eine 20-jährige Forschungsbemühung erfordern kann.

**[0006]** Beim Adressieren des zweiten dieser Faktoren sind manche Arzneistoff-Entdeckungsansätze, die die Suche nach neuen Antibiotika beschleunigen können, vorgeschlagen worden. Zum Beispiel ist über Bemühungen, um durch Hochleistungs-Screening auf neue antibiotische Verbindungen zu screenen und diese zu identifizieren, berichtet worden, aber bis jetzt sind keine wichtigen Führungsverbindungen durch diesen Weg entdeckt worden.

**[0007]** Einige Ansätze, die Antisense-Mittel involvieren, die gestaltet sind, um die Expression von bakteriellen Resistenz-Genen zu blockieren oder um zelluläre RNA-Ziele wie die rRNA in der ribosomalen 30S-Untereinheit anzuvisieren, sind vorgeschlagen worden (Good et al., 1998; Rahman et al., 1991). Im Allgemeinen sind diese Ansätze geringfügig erfolgreich gewesen, vermutlich aufgrund einer schwachen Aufnahme des Antisense-Mittels (z. B. Summerton et al., 1997) oder der Notwendigkeit, dass die behandelten Zellen eine hohe Permeabilität für Antibiotika zeigen (Good et al., 1998).

**[0008]** Es gibt daher einen steigenden Bedarf für neue Antibiotika, die (i) nicht den Haupttypen der Antibiotika-Resistenz unterliegen, die derzeit eine antibiotische Behandlung von Bakterien behindert, (ii) schnell und mit einem gewissen, vernünftigen Grad der Vorhersagbarkeit im Bezug auf die Zielbakterien-Spezifität entwickelt werden können, (iii) auch für eine Breitspektrum-Aktivität gestaltet werden können, (iv) in niedrigen Dosen wirksam sind, was zum Teil heißt, dass sie durch Wildtyp-Bakterien oder sogar durch Bakterien, die eine reduzierte Permeabilität für Antibiotika haben, wirksam aufgenommen werden, und (v) wenige Nebenwirkungen zeigen.

**[0009]** In einem Aspekt liefert die Erfindung eine antibakterielle Verbindung, bestehend aus einem im Wesentlichen ungeladenen Antisense-Oligomer, das 10 bis 40 Nucleotid-Untereinheiten enthält, wobei jede der Untereinheiten einen Morpholinring umfasst, der eine basenpaarbildende Einheit trägt, die wirksam ist, mittels Watson-Crick-Basenpaarung an eine entsprechende Nucleotidbase zu binden, wobei das Antisense-Oligomer eine Nucleinsäuresequenz mit einer Länge von mindestens 10 Nucleotiden einschließt, die in der Lage ist, stabil mit einer bakteriellen 16S- oder 23S-rRNA-Nucleinsäuresequenz zu hybridisieren, wobei angrenzende Untereinheiten durch ungeladene Bindungen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus ungeladenen Phosphoramidat- und Phosphordiamidatbindungen, oder durch geladene Phosphoramidatbindungen verbunden sind, wobei das Verhältnis von ungeladenen Bindungen zu geladenen Bindungen in dem Oligomer mindestens 4:1, vorzugsweise mindestens 5:1 und mehr bevorzugt mindestens 8:1 ist. In einer Ausführungsform ist das Oligomer vollständig ungeladen.

**[0010]** Vorzugsweise ist das Oligomer in der Lage, mit der bakteriellen Sequenz bei einem Tm-Wert zu hybridisieren, der im Wesentlichen größer ist als der Tm-Wert eines Duplexes, der aus einer entsprechenden DNA und derselben bakteriellen Sequenz zusammengesetzt ist. Alternativ ist das Oligomer in der Lage, mit der bakteriellen Sequenz bei einem Tm-Wert zu hybridisieren, der wesentlich größer als 37°C, vorzugsweise größer als 50°C und stärker bevorzugt im Bereich von 60–80°C ist.

**[0011]** Die ungeladenen Bindungen und in einer Ausführungsform alle Bindungen in solch einem Oligomer werden vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Strukturen, die in den [Fig. 2A](#) bis [Fig. 2D](#) dargestellt sind, wobei X Fluor, ein Alkyl oder substituiertes Alkyl, ein Alkoxy oder substituiertes Alkoxy, ein Thioalkoxy oder substituiertes Thioalkoxy oder ein substituiertes, monosubstituierter oder disubstituierter Stickstoff ist; Z Schwefel oder Sauerstoff ist;  $Y_1$  in den [Fig. 2B](#) und [Fig. 2D](#) Schwefel, Stickstoff, Kohlenstoff oder Sauerstoff ist und  $Y_2$  in [Fig. 2C](#) Methylen, Schwefel oder Sauerstoff ist; und jedes  $P_i$  und  $P_j$  eine Purin- oder Pyrimidinbasenpaarbildende Einheit ist, die wirksam ist, mittels basenspezifischer Wasserstoffbindung an eine Base in einem Polynucleotid zu binden. Besonders bevorzugt sind Phosphordiamidat-verknüpfte Oligomere, wie bei [Fig. 2B](#) dargestellt, wobei  $X = NR_2$ , R ein Wasserstoff oder Methyl ist,  $Y_1$  Sauerstoff ist und Z Sauerstoff ist.

**[0012]** Die Länge des Oligomers ist vorzugsweise 12 bis 25 Untereinheiten. In einer Ausführungsform ist das Oligomer ein Phosphordiamidat-verknüpftes Morpholin-Oligomer, das eine Länge von 15 bis 20 Untereinheiten und stärker bevorzugt 17–18 Untereinheiten hat.

**[0013]** In ausgewählten Ausführungsformen ist die Zielsequenz eine Breitspektrumsequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den SEQ ID NOs: 15, 16 und 21–25. In anderen Ausführungsformen ist die Zielsequenz komplementär zu einer 16S-rRNA-Konsensus-Sequenz Gram-positiver Bakterien, z. B. SEQ ID NOs: 27–28, oder ist komplementär zu einer 16S-rRNA-Konsensus-Sequenz Gram-negativer Bakterien, z. B. SEQ ID NOs: 29–30.

**[0014]** Andere Zielsequenzen können für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung einer Infektion verwendet werden, die durch verschiedene Organismen produziert wird, zum Beispiel:

- (a) *E. coli*, wobei die Sequenz ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 32 und SEQ ID NO: 35;
- (b) *Salmonella thyphimurium*, wobei die Sequenz ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 18 und SEQ ID NO: 36;
- (c) *Pseudomonas aeruginosa*, wobei die Sequenz ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 und SEQ ID NO: 43;
- (d) *Vibrio cholera*, wobei die Sequenz ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 und SEQ ID NO: 47;
- (e) *Neisseria gonorrhoea*, wobei die Sequenz ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 und SEQ ID NO: 51;
- (f) *Staphylococcus aureus*, wobei die Sequenz ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 und SEQ ID NO: 55;
- (g) *Mycobacterium tuberculosis*, wobei die Sequenz ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 und SEQ ID NO: 59;
- (h) *Helicobacter pylori*, wobei die Sequenz ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 und SEQ ID NO: 63;
- (i) *Streptococcus pneumoniae*, wobei die Sequenz ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 und SEQ ID NO: 67;
- (j) *Treponema palladium*, wobei die Sequenz ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 und SEQ ID NO: 71;
- (k) *Chlamydia trachomatis*, wobei die Sequenz ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 und SEQ ID NO: 75;
- (l) *Bartonella henselae*, wobei die Sequenz ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 und SEQ ID NO: 79;
- (m) *Hemophilis influenza*, wobei die Sequenz ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 und SEQ ID NO: 83;
- (n) *Shigella dysenteriae*, wobei die Sequenz als SEQ ID NO: 88 dargestellt ist; oder
- (o) *Enterococcus faecium*, wobei die Sequenz als SEQ ID NO: 92 dargestellt ist.

**[0015]** In anderen Ausführungsformen ist die Zielsequenz eine Antisense-Oligomersequenz, ausgewählt aus einer der folgenden Gruppen, für die Verwendung in der Behandlung einer Infektion, produziert durch:

- (a) *E. coli*, *Salmonella thyphimurium* und *Shigella dysenteriae*, wobei die Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 und SEQ ID NO: 86 und SEQ ID NO: 87;
- (b) *E. coli*, *Salmonella thyphimurium* und *Hemophilis influenza*, wobei die Sequenz als SEQ ID NO: 31 dargestellt ist;
- (c) *E. coli* und *Shigella dysenteriae*, wobei die Sequenz als SEQ ID NO: 17 dargelegt ist;

- (d) *E. coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Shigella dysenterae*, *Hemophilis influenza* und *Vibrio cholera*, wobei die Sequenz als SEQ ID NO: 44 dargestellt ist;
- (e) *Staphylococcus aureus* und *Bartonella henselae*, wobei die Sequenz als SEQ ID NO: 52 dargestellt ist;
- (f) *Salmonella thyphimurium*, *Hemophilis influenza* und *Treponema palladium*, wobei die Sequenz als SEQ ID NO: 68 dargestellt ist; oder
- (g) *E. coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Shigella dysenterae*, *Hemophilis influenza* und *Neisseria gonorrhoea*, wobei die Sequenz als SEQ ID NO: 84 dargestellt ist.

**[0016]** In einem verwandten Aspekt liefert die Erfindung die Verwendung eines im Wesentlichen ungeladenen Antisense-Oligomers, wie oben beschrieben, für die Herstellung eines Arzneimittels für das Behandeln einer bakteriellen Infektion in einem menschlichen oder Säugetier-Patienten. Verschiedene ausgewählte Ausführungsformen des Oligomers und der Zielsequenz sind, wie oben beschrieben. Vorzugsweise wird das Antisense-Oligomer in einer Menge und Art verabreicht, die wirksam ist, um in einer Gipfel-Blutkonzentration von mindestens 200–400 nM Antisense-Oligomer zu resultieren. Das Oligomer kann zum Beispiel für das Behandeln von bakteriellen Infektionen der Haut, wobei die Verabreichung auf einem topischen Weg erfolgt, oder für die Behandlung einer bakteriellen respiratorischen Infektion verwendet werden, wobei die Verabreichung durch Inhalation erfolgt.

**[0017]** In einem weiteren verwandten Aspekt liefert die Erfindung eine Nutztier- und Geflügelfutterzusammensetzung, enthaltend ein Futtergetreide, das mit einer subtherapeutischen Menge einer antibakteriellen Verbindung ergänzt ist, wobei die Verbindung aus einem im Wesentlichen ungeladenen Antisense-Oligomer, wie oben beschrieben, besteht.

**[0018]** In einem Verfahren zum Füttern von Nutztieren und Geflügel mit einem Futtergetreide, das mit subtherapeutischen Spiegeln eines Antibiotikums ergänzt ist, wird auch eine Verbesserung in Betracht gezogen, in der das Futtergetreide mit einer subtherapeutischen Menge einer antibakteriellen Verbindung des oben beschriebenen Typs ergänzt wird.

**[0019]** Diese und andere Aufgaben und Eigenschaften der Erfindung werden vollständiger offensichtlich werden, wenn die folgende detaillierte Beschreibung im Zusammenhang mit den begleitenden Figuren und Beispielen gelesen wird.

**[0020]** **Fig. 1** zeigt einige bevorzugte Morpholintyp-Untereinheiten, die 5-Atom-(A), sechs-Atom-(B) und sieben-Atom-(C-D)-Bindungsgruppen aufweisen, die für das Bilden von Polymeren geeignet sind;

**[0021]** Die **Fig. 2A–D** zeigen das wiederholende Untereinheitssegment von beispielhaften Morpholin-Oligonucleotiden, bezeichnet A bis D, die entsprechend unter Verwendung der Untereinheiten A–D von **Fig. 1** konstruiert wurden;

**[0022]** **Fig. 3** zeigt ein Beispiel eines ungeladenen Bindungstyps in Oligonucleotid-Analogen;

**[0023]** **Fig. 4** zeigt die Ergebnisse einer Untersuchung über die Wirkung eines Phosphordiamidat-Morpholin-Antisense-Oligomers (PMO), bezeichnet VRE-2 (SEQ ID NO: 92) (siehe Tabelle 10), das gegen eine *Enterococcus faecium*-16S-rRNA-Sequenz gerichtet ist, alleine oder in Kombination mit 50 µM eines Antisense-Oligomers gegen c-myc ist (SEQ ID NO: 139), auf die bakterielle Koloniebildung in *E. coli*, dargestellt als Prozent-Lebensfähigkeit;

**[0024]** **Fig. 5** zeigt die Ergebnisse einer Untersuchung über die Wirkung von verschiedenen Konzentrationen eines PMO, das die SEQ ID NO: 15 hat (Breitspektrum; siehe Tabelle 2A), gerichtet gegen eine bakterielle 16S-rRNA-Konsensus-Sequenz, auf die bakterielle Koloniebildung in *E. coli*, dargestellt als Prozent-Inhibierung der Koloniebildung;

**[0025]** **Fig. 6** zeigt die Ergebnisse einer Untersuchung, in der PMO-Oligomere, die verschiedene unterschiedliche Regionen der *Enterococcus faecium*-16S-rRNA anzielen, bezeichnet AVI-1-23-22, -32, -45, -33, -34, -44, -35 und -36 (SEQ ID NOs: 92, 102, 115, 103, 104, 114, 105 und 106), angezeigt in der Figur als 22, 23, 45, 33, 34, 44, 35 beziehungsweise 36, zu 1 µM zu Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium*(VRE)-Kulturen zugefügt wurden, wobei die Ergebnisse als Prozentlebensfähigkeit dargestellt werden;

**[0026]** **Fig. 7** zeigt die Ergebnisse einer Untersuchung, in der PMO-Oligomere, die verschiedene unterschiedliche Regionen von *Enterococcus faecium*-23S-rRNA anzielen, bezeichnet AVI-1-23-46, -47, -48, -49 und -50

(SEQ ID NOs: 116–120), angezeigt in der Figur als 46, 47, 48, 49 beziehungsweise 50, zu 1  $\mu\text{M}$  zu Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium*-Kulturen zugefügt wurden, wobei die Ergebnisse als Prozent-Lebensfähigkeit dargestellt werden;

**[0027]** **Fig. 8** zeigt die Ergebnisse einer Untersuchung über die Wirkung von 1  $\mu\text{M}$  PMOs von verschiedenen Längen, die gegen die 16S-rRNA eines Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium*-Bakterienstamms gerichtet sind, auf die Lebensfähigkeit der Bakterien (Prozent-Lebensfähigkeit, berichtet als Prozent einer unbehandelten Kontrolle). Die PMO-Sequenzen, die den Oligomerlängen entsprechen, sind in Tabelle 12 gezeigt, welche das Antisense-Targeting von 16S-rRNA in VRE illustriert, berichtet als Prozent-Inhibition (100 – Prozent der unbehandelten Kontrolle);

**[0028]** **Fig. 9** zeigt die Ergebnisse einer Untersuchung über die Wirkung von 1  $\mu\text{M}$  PMO, gerichtet gegen *Enterococcus faecium*-16S-rRNA, bezeichnet VRE-2, AVI 1-23-22 (SEQ ID NO: 92), auf die bakterielle Koloniebildung in VRE, dargestellt als Prozent-Lebensfähigkeit (Prozent der Kontrolle), bestimmt an den Tagen 1 bis 6; und

**[0029]** **Fig. 10A–B** zeigen die Ergebnisse einer Untersuchung über die Wirkung von 1  $\mu\text{M}$  eines PMO, gerichtet gegen *Enterococcus faecium*-16S-rRNA (SEQ ID NO: 92), alleine oder in Kombination mit (A) 3  $\mu\text{M}$  Vancomycin oder (B) 3  $\mu\text{M}$  Ampicillin, auf das Wachstum von VRE, wobei die Ergebnisse als Prozentlebensfähigkeit berichtet werden.

## I. Definitionen

**[0030]** Die Begriffe unten, wie hierin verwendet, haben die folgenden Bedeutungen, außer wenn es anderweitig angezeigt wird:

Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff „16S-ribosomale RNA“, auch genannt „16S-rRNA“, eine RNA, die ein Teil der Struktur eines Ribosoms ist und in die Synthese von Proteinen involviert ist.

**[0031]** Der Begriff „Polynucleotid“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein polymeres Molekül, das ein Gerüst hat, das die Basen trägt, die zu einer Wasserstoffbindung an typische Polynucleotide in der Lage sind, wobei das Polymergerüst die Basen in einer Weise darlegt, um eine solche Wasserstoffbindung in einer sequenzspezifischen Weise zwischen dem polymeren Molekül und einem typischen Polynucleotid (z. B. einer einzelsträngigen RNA, doppelsträngigen RNA, einzelsträngigen DNA oder doppelsträngigen DNA) zu ermöglichen. „Polynucleotide“ schließen Polymere mit Nucleotiden ein, die ein N- oder C-Glycosid einer Purin- oder Pyrimidinbase sind, und Polymere, die Nicht-Standard-Nucleotidgerüste enthalten, zum Beispiel Gerüste, die unter Verwendung von Phosphordiamidat-Morpholin-Chemie, Polyamid-Bindungen (z. B. Peptid-Nucleinsäuren oder PNAs) und anderen synthetischen sequenzspezifischen Nucleinsäuremolekülen gebildet werden.

**[0032]** Wie hierin verwendet, werden die Begriffe „Antisense-Oligonucleotid“ und „Antisense-Oligomer“ austauschbar verwendet und bezeichnen eine Sequenz von Nucleotidbasen und ein Untereinheit-zu-Untereinheit-Gerüst, das es dem Antisense-Oligomer ermöglicht, an eine Zielnucleinsäure-(z. B. RNA)Sequenz durch Watson-Crick-Basenpaarung zu hybridisieren, um einen Nucleinsäure:Oligomer-Heteroduplex in der Zielsequenz zu bilden. Das Oligomer kann eine genaue Sequenzkomplementarität zu der Zielsequenz oder eine fast genaue Komplementarität haben. In einer beispielhaften Anwendung kann ein solches Antisense-Oligomer die Funktion von 16S- oder 23S-rRNA, die eine Zielsequenz enthält, blockieren oder inhibieren, kann an einen doppelsträngigen oder einzelsträngigen Teil der 16S- oder 23S-rRNA-Zielsequenz binden, kann die mRNA-Translation und/oder Proteinsynthese inhibieren und kann als auf eine Sequenz „gerichtet“ gelten, mit der es spezifisch hybridisiert.

**[0033]** Wie hierin verwendet, „hybridisiert“ ein Oligonucleotid oder Antisense-Oligomer „spezifisch“ oder „stabil“ an ein Zielpolynucleotid, wenn das Oligomer unter physiologischen Bedingungen mit einem  $T_m$ -Wert, der im Wesentlichen größer als 37°C, vorzugsweise mindestens 50°C und typischerweise 60°C–80°C oder höher ist, an das Ziel hybridisiert. Eine solche Hybridisierung entspricht vorzugsweise stringenten Hybridisierungsbedingungen. Bei einer vorgegebenen ionischen Stärke und einem vorgegebenen pH-Wert ist der  $T_m$ -Wert die Temperatur, bei der 50% einer Zielsequenz an ein komplementäres Polynucleotid hybridisiert.

**[0034]** Polynucleotide werden als „komplementär“ zu einander beschrieben, wenn die Hybridisierung in einer anti-parallelen Konfiguration zwischen zwei einzelsträngigen Polynucleotiden erfolgt. Ein doppelsträngiges Polynucleotid kann zu einem anderen Polynucleotid „komplementär“ sein, wenn zwischen einem der Stränge des ersten Polynucleotids und dem zweiten eine Hybridisierung erfolgen kann. Komplementarität (der Grad, zu

dem ein Polynucleotid mit einem anderen komplementär ist) ist in Bezug auf den Anteil (d. h. den Prozentsatz) der Basen in den gegenüberliegenden Strängen, von denen erwartet wird, dass sie miteinander Wasserstoffbindungen bilden, gemäß den allgemein anerkannten Basenpaarungs-Regeln quantifizierbar.

**[0035]** Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff „Konsensus-Sequenz“ in Bezug auf die 16S- oder 23S-rRNA-Sequenzen eine Sequenz, die einer bestimmten Gruppe von Organismen gemeinsam ist oder durch diese geteilt wird. Diese Konsensus-Sequenz zeigt die Nucleinsäure, die am häufigsten an jeder Position im Polynucleotid gefunden wird. Zum Beispiel ist eine Gram-negative bakterielle 16S- oder 23S-rRNA-Konsensus-Sequenz Gram-negativen Bakterien gemeinsam und wird im Allgemeinen nicht in Bakterien gefunden, die nicht Gram-negativ sind.

**[0036]** Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff „konserviert“ in Bezug auf 16S- oder 23S-rRNA-Sequenzen auch eine Sequenz, die einer bestimmten Gruppe von Organismen (z. B. Bakterien) gemeinsam ist oder durch diese geteilt wird.

**[0037]** Eine „Untereinheit“ eines Oligonucleotids oder Oligonucleotid-Analogs bezeichnet eine Nucleotid(oder Nucleotid-Analog)-Einheit des Oligomers. Der Begriff kann sich auf die Nucleotid-Einheit mit oder ohne angelegerte Zwischen-Untereinheitsbindungen beziehen, wenn jedoch auf eine „geladene Untereinheit“ Bezug genommen wird, befindet sich die Ladung typischerweise in der Zwischen-Untereinheitsbindung (z. B. einer Phosphat- oder Phosphorthioat-Bindung).

**[0038]** Wie hierin verwendet, bezeichnet ein „Morpholin-Oligomer“ ein polymeres Molekül, das ein Gerüst hat, das Basen trägt, die zur Wasserstoffbindung an typische Polynucleotide in der Lage sind, wobei dem Polymer eine Pentosezuckergerüst-Einheit fehlt und genauer ein Ribosegerüst fehlt, das durch Phosphodiester-Bindungen verknüpft ist, was typisch für Nucleotide und Nucleoside ist, das aber stattdessen einen Ring-Stickstoff enthält, wobei die Kopplung durch den Ring-Stickstoff erfolgt. Ein typisches „Morpholin“-Oligonucleotid ist aus Morpholin-Untereinheitsstrukturen der Form, die in [Fig. 1A–Fig. 1D](#) gezeigt ist, zusammengesetzt, wobei (i) die Strukturen durch Phosphor-enthaltende Bindungen, die ein bis drei Atome lang sind, zusammen verknüpft sind, was den Morpholin-Stickstoff von einer Untereinheit mit dem 5' exocyclischen Kohlenstoff einer benachbarten Untereinheit verbindet, und (ii) B eine Purin- oder Pyrimidin-basenpaarbildende Einheit ist, die wirksam ist, um durch basenspezifische Wasserstoffbindung an eine Base in einem Polynucleotid zu binden.

**[0039]** Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff „PMO“ ein Phosphordiamidat-Morpholin-Oligomer, wie unten weiter beschrieben, worin das Oligomer ein Polynucleotid von etwa 10–40 Basen Länge, vorzugsweise 12–25 Basen Länge ist. Dieser bevorzugte Aspekt der Erfindung wird in [Fig. 2B](#) illustriert, wo die zwei Untereinheiten durch eine Phosphordiamidat-Bindung verknüpft sind.

**[0040]** Wie hierin verwendet, ist ein „Nuclease-resistentes“ oligomeres Molekül (Oligomer) eines, dessen Gerüst nicht für eine Nucleasespaltung einer Phosphodiester-Bindung empfänglich ist. Phosphoramidat- oder Phosphordiamidat-verknüpfte Morpholin-Oligonucleotide der vorliegenden Erfindung, die ungeladene Gerüste aufweisen, sind Nuclease-resistente Antisense-Oligomere.

**[0041]** „Alkyl“ bezeichnet ein vollständig gesättigtes acyclisches monovalentes Radikal, enthaltend Kohlenstoff und Wasserstoff, das verzweigt oder eine gerade Kette sein kann. Beispiele von Alkylgruppen sind Methyl, Ethyl, n-Butyl, t-Butyl, n-Heptyl und Isopropyl. „Niedrigeres Alkyl“ bezeichnet ein Alkyl-Radikal von ein bis sechs Kohlenstoffatomen und vorzugsweise ein bis vier Kohlenstoffatomen, wie durch Methyl, Ethyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl und t-Butyl veranschaulicht.

**[0042]** Wie hierin verwendet, ist eine erste Sequenz eine „Antisense-Sequenz“ im Bezug auf eine zweite Sequenz, wenn ein Polynucleotid mit einer ersten Sequenz unter physiologischen Bedingungen spezifisch an ein Polynucleotid, das eine zweite Sequenz hat, bindet oder spezifisch damit hybridisiert.

**[0043]** Wie hierin verwendet, bezeichnet ein „basenspezifischer intrazellulärer Bindungsvorgang, der eine Ziel-RNA involviert“, die spezifische Bindung eines Oligomers an eine Ziel-RNA-Sequenz innerhalb einer Zelle. Die Basenspezifität einer solchen Bindung ist sequenzspezifisch. Zum Beispiel kann ein einzelsträngiges Polynucleotid spezifisch an ein einzelsträngiges Polynucleotid binden, das in der Sequenz komplementär ist.

**[0044]** Wie hierin verwendet, bezeichnet „Nuclease-resistenter Heteroduplex“ einen Heteroduplex, der durch die Bindung eines Antisense-Oligomers an sein komplementäres Ziel gebildet wird, sodass der Heteroduplex gegen in vivo-Degradierung durch ubiquitäre intrazelluläre und extrazelluläre Nucleasen resistent ist.

**[0045]** Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff „bakterielle Breitspektrumsequenz“ in Bezug auf bakterielle 16S-rRNA ein Oligonucleotid der Erfindung, das zu einem gewissen Segment der meisten, wenn nicht von allen der hierin beschriebenen bakteriellen 16S-rRNA-Sequenzen ein Antisense-Oligonucleotid ist. Eine entsprechende Definition trifft auf bakterielle 23S-rRNA zu. Beispielhafte bakterielle Breitspektrumsequenzen, die hierin beschrieben sind, schließen die Antisense-Oligomere ein, die als SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 und SEQ ID NO: 23, die Antisense-Oligomere zu einer 16S-rRNA-Sequenz von *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella thyphimurium* (*S. thyphi*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Vibrio cholera*, *Neisseria gonorrhoea* (*N. gonorrhoea*), *Staphylococcus aureus* (*Staph. aureus*), *Mycobacterium tuberculosis* (*Myco. tubercul.*), *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), *Streptococcus pneumoniae* (*Strep. pneumoniae*), *Treponema palladium* (*Treponema pallad.*), *Chlamydia trachomatis* (*Chlamydia trach.*), *Bartonella henselae* (*Bartonella hens.*), *Hemophilis influenza* (*H. influenza*) und *Shigella dysenteriae* (*Shigella dys.*) sind (siehe Tabelle 5A), und als SEQ ID NOs 24–25 dargelegt sind, die Antisense-Oligomere zu der 16s-rRNA der Mehrzahl dieser Organismen sind (siehe Tabelle 5B).

**[0046]** Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff „bakterielle Engspektrumsequenz“ in Bezug auf bakterielle 16S-rRNA ein Oligonucleotid der Erfindung, das zu bestimmten, aber nicht den meisten oder allen der hierin beschriebenen bakteriellen 16S-rRNA-Sequenzen ein Antisense-Oligonucleotid ist. Wieder trifft eine entsprechende Definition für bakterielle 23S-rRNA zu. Eine bakterielle Engspektrumsequenz kann spezifisch für ein Bakterium oder mehrere verschiedene Bakterien sein, z. B. ein Antisense-Oligomer, das ein Antisense-Oligomer zu *E. coli*-, *S. thyphi*- und *Shigella dys.*-16S-rRNA ist, aber nicht zu den anderen hierin beschriebenen bakteriellen 16S-rRNA-Sequenzen, wie durch SEQ ID NO: 31 veranschaulicht, oder ein Antisense-Oligomer, das ein Antisense-Oligomer zu der *E. coli* 16S-rRNA-Sequenz, aber nicht den anderen hierin beschriebenen bakteriellen 16S-rRNA-Sequenzen ist, wie durch SEQ ID NO: 32 veranschaulicht.

**[0047]** Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff „modulierende Expression“ in Bezug auf Oligonucleotide die Fähigkeit eines Antisense-Oligomers, die Expression eines bestimmten Proteins durch Wechselwirken mit der Expression oder Translation der RNA entweder zu verstärken oder zu reduzieren.

**[0048]** Wie hierin verwendet, bezeichnet eine „wirksame Menge“ in Bezug auf ein Antisense-Oligomer die Menge des Antisense-Oligomers, die entweder als eine Einzeldosis oder als Teil einer Reihe von Dosen an einen Säuger Patienten verabreicht wird, die wirksam ist, um eine biologische Aktivität, z. B. die Expression einer ausgewählten Nucleinsäurezielsequenz zu inhibieren.

**[0049]** Wie hierin verwendet, ist eine „Behandlung“ eines Individuums oder einer Zelle jeder Typ von Intervention, die als Mittel bereitgestellt wird, um den natürlichen Zustand des Individuums oder der Zelle zu verändern. Behandlung schließt die Verabreichung eines Arzneimittels ein, ist aber nicht darauf limitiert, und kann entweder prophylaktisch oder folgend auf den Beginn eines pathologischen Geschehens oder den Kontakt mit einem ethologischen Mittel durchgeführt werden.

**[0050]** Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff „verbessertes therapeutisches Ergebnis“ in Bezug auf einen Patienten, der als mit einem bestimmten Bakterium infiziert diagnostiziert wurde, eine Verlangsamung oder Reduzierung im Wachstum der Bakterien und/oder eine Verminderung oder die Eliminierung von nachweisbaren Symptomen, die typischerweise mit der Infektion durch jenes bestimmte Bakterium assoziiert sind.

## II. Antisense-Oligomere: Selektionskriterien

**[0051]** Antisense-Verbindungen, die in der Erfindung angewendet werden, erfüllen vorzugsweise einige Kriterien der Struktur und Eigenschaften, die in den Unterabschnitten unten in Betracht gezogen werden.

### A. Basensequenz und Länge

**[0052]** Die Antisense-Verbindung hat eine Basensequenz, die gegen eine ausgewählte RNA-Zielsequenz gerichtet ist. Die Region der Komplementarität mit der Ziel-RNA-Sequenz kann so kurz wie 10–12 Basen sein, ist aber vorzugsweise 13–20 Basen und bevorzugter 17–20 Basen, um den erforderlichen Bindungs-T<sub>m</sub>-Wert, wie unten diskutiert, zu erreichen.

**[0053]** In manchen Fällen ist das Ziel für die Modulierung der Aktivität der 16S-rRNA unter Verwendung der Antisense-Oligomere der Erfindung eine Sequenz in einer doppelsträngigen Region der 16s-rRNA wie dem Peptidyltransferase-Zentrum, der Alpha-Sarcinschleife oder der mRNA-Bindungsregion der 16S-rRNA-Sequenz. In anderen Fällen ist das Ziel für die Modulierung der Genexpression eine Sequenz in einer einzelsträn-

gigen Region der bakteriellen 16S- oder 23S-rRNA. Das Ziel kann eine Konsensus-Sequenz für bakterielle 16S- oder 23S-rRNAs im Allgemeinen, eine Sequenz, die der 16s- oder 23S-rRNA von einem oder mehreren Typ(en) von Bakterien (z. B. Gram-positiven oder Gram-negativen Bakterien) gemeinsam ist, oder die spezifisch für eine bestimmte 16S- oder 23S-rRNA-Sequenz ist, sein.

**[0054]** Das Oligomer kann 100% komplementär zu der bakteriellen RNA-Zielsequenz sein, oder es kann Fehlpaarungen einschließen, z. B. um Varianten zu beherbergen, so lange der Heteroduplex, der zwischen dem Oligomer und der bakteriellen RNA-Zielsequenz gebildet wird, ausreichend stabil ist, um der Wirkung von zellulären Nucleasen oder anderen Arten des Abbaus, die in vivo erfolgen können, zu widerstehen. Fehlpaarungen, wenn sie vorhanden sind, sind zu den Endregionen des Hybridduplex hin weniger destabilisierend als in der Mitte. Die Zahl der erlaubten Fehlpaarungen wird gemäß gut verstandenen Prinzipien der Duplex-Stabilität von der Länge des Oligomers, dem Prozentsatz von G:C-Basenpaaren im Duplex und der Position der Fehlpaarung(en) im Duplex abhängen. Obwohl solch ein Antisense-Polymer nicht notwendigerweise 100% komplementär zu der bakteriellen RNA-Zielsequenz ist, ist es wirksam, um die Zielsequenz stabil und spezifisch zu binden, sodass eine biologische Aktivität des Nucleinsäureziels, z. B. die Expression eines/von bakteriellen Proteins/Proteinen, moduliert wird.

**[0055]** Oligomere, die so lange wie 40 Basen sind, können geeignet sein, wobei mindestens die Minimalzahl der Basen, z. B. 10–15 Basen, komplementär zu der RNA-Zielsequenz ist. Im Allgemeinen ist jedoch die erleichterte oder aktive Aufnahme in Zellen bei Oligomerlängen von weniger als etwa 30, vorzugsweise weniger als 25 und mehr bevorzugt 20 oder weniger Basen optimiert. Für PMO-Oligomere, die weiter unten beschrieben werden, erfolgen ein optimales Gleichgewicht von Bindungsstabilität und Aufnahme im Allgemeinen bei Längen von 17–18 Basen.

#### B. Duplex-Stabilität (T<sub>m</sub>-Wert)

**[0056]** Das Oligomer muss einen stabilen Hybridduplex mit der Zielsequenz bilden. Vorzugsweise ist das Oligomer in der Lage, an die RNA-Zielsequenz mit einem T<sub>m</sub>-Wert zu hybridisieren, der im Wesentlichen größer als der T<sub>m</sub>-Wert eines Duplex ist, der aus einer entsprechenden DNA und derselben RNA-Zielsequenz zusammengesetzt ist. Das Antisense-Oligomer wird einen Bindungs-T<sub>m</sub>-Wert in Bezug auf eine RNA mit komplementärer Sequenz von mehr als der Körpertemperatur und vorzugsweise mehr als 50°C haben. T<sub>m</sub>-Werte im Bereich von 60–80°C oder mehr sind bevorzugt. Der T<sub>m</sub>-Wert einer Antisense-Verbindung in Bezug auf die RNA mit komplementärer Sequenz kann durch konventionelle Verfahren wie jene, die durch Harnes et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press 1985, S. 107–108 beschrieben wurden, gemessen werden. Gemäß gut bekannten Prinzipien kann der T<sub>m</sub>-Wert einer Oligomer-Verbindung in Bezug auf ein Komplementärbasen-RNA-Hybrid durch Erhöhen der Länge (in Basenpaaren) des Heteroduplex erhöht werden. Zur selben Zeit kann es zu Zwecken der Optimierung des Zelltransports vorteilhaft sein, die Größe des Oligomers zu limitieren. Aus diesem Grund werden Verbindungen, die einen hohen T<sub>m</sub>-Wert (50°C oder mehr) bei einer Länge von 15–20 Basen oder weniger zeigen, gegenüber jenen, die 20+ Basen für hohe T<sub>m</sub>-Werte erfordern, bevorzugt werden.

**[0057]** Es ist auch bekannt, dass ein Erhöhen des Verhältnisses von C:G-gepaarten Basen im Duplex im Allgemeinen den T<sub>m</sub>-Wert einer Oligomer-Verbindung erhöht. Untersuchungen zu Gunsten der Erfindung legen nahe, dass ein Maximieren der Zahl von C-Basen im Antisense-Oligomer besonders günstig ist.

#### C. Aufnahme durch Zellen

**[0058]** Um adäquate intrazelluläre Spiegel zu erzielen, muss das Antisense-Oligomer aktiv durch die Zellen aufgenommen werden, was heißt, dass die Verbindung durch erleichterten oder aktiven Transport aufgenommen wird, wenn sie in freier (nicht in einem Komplex) Form verabreicht wird, oder durch einen endocytotischen Mechanismus aufgenommen wird, wenn sie in einer Komplex-Form verabreicht wird.

**[0059]** Wenn die Antisense-Verbindung in Komplex-Form verabreicht wird, ist das komplexbildende Mittel typischerweise ein Polymer, z. B. ein kationisches Lipid, Polypeptid oder nicht-biologisches kationisches Polymer, das eine entgegengesetzte Ladung zu einer Nettoladung auf der Antisense-Verbindung hat. Verfahren zum Bilden von Komplexen, einschließlich Zweischicht-Komplexen, zwischen anionischen Oligonucleotiden und kationischen Lipid- oder anderen Polymer-Komponenten sind gut bekannt. Zum Beispiel wird die liposomale Zusammensetzung Lipofectin® (Felgner et al., 1987), enthaltend das kationische Lipid DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid) und das neutrale Phospholipid DOPE (Dioleylphosphatidylethanolamin), weithin verwendet. Nach der Verabreichung wird der Komplex durch Zellen mittels eines endocytotischen Mechanismus aufgenommen, was typischerweise eine Partikel-Einkapselung in endo-

somale Körper involviert. Die Fähigkeit des Antisense-Mittels, zellulären Nucleasen zu widerstehen, fördert das Überleben und die schlussendliche Abgabe des Mittels an das Zell-Cytoplasma.

**[0060]** Im Fall, in dem das Mittel in freier Form verabreicht wird, sollte das Mittel im Wesentlichen ungeladen sein, was heißt, dass eine Mehrheit seiner Zwischenuntereinheits-Bindungen bei einem physiologischen pH-Wert ungeladen ist. Experimente, die zu Gunsten der Erfindung durchgeführt wurden, weisen darauf hin, dass eine kleine Zahl von Nettoladungen, z. B. 1–2 für ein 15- bis 20-mer Oligomer, die Zellaufnahme von bestimmten Oligomeren mit im Wesentlichen ungeladenen Gerüsten verstärken kann. Die Ladungen können auf dem Oligomer selbst, z. B. in den Gerüstbindungen, getragen werden oder können terminale geladene Gruppen-Anhänge sein. Vorzugsweise ist die Zahl der geladenen Bindungen nicht mehr als eine geladene Bindung pro vier ungeladene Bindungen.

**[0061]** Ein Oligomer kann auch sowohl negativ als auch positiv geladene Gerüst-Bindungen enthalten, so lange zwei entgegengesetzte Ladungen im Wesentlichen ausgleichend sind und vorzugsweise keine Abschnitte von mehr als 3–5 aufeinanderfolgenden Untereinheiten von jeder Ladung einschließen. Zum Beispiel kann das Oligomer eine vorgegebene Zahl von anionischen Bindungen und eine vergleichbare Zahl von kationischen Bindungen haben, wie N,N-Diethylendiaminphosphoramidate (Dagle). Die Nettoladung ist vorzugsweise neutral oder höchstens 1–2 Nettoladungen pro Oligomer, wie oben.

**[0062]** Zusätzlich dazu, dass das Antisense-Mittel im Wesentlichen oder vollständig ungeladen ist, ist es vorzugsweise ein Substrat für ein Membran-Transportersystem (d. h. ein Membranprotein oder Membranproteine), das zum Ermöglichen des Transports oder zum aktiven Transportieren des Oligomers über die Zellmembran in der Lage ist. Diese Eigenschaft kann durch einen einer Reihe von Tests, wie folgt, für die Oligomer-Interaktion oder Zellaufnahme bestimmt werden.

**[0063]** Ein erster Test bewertet die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren durch Untersuchen der Fähigkeit einer Oligomer-Verbindung, ein ausgewähltes geladenes Oligomer, z. B. ein Phosphorthioat-Oligomer auf einer Zelloberfläche zu verlagern oder durch dieses verlagert zu werden. Die Zellen werden mit einer vorgegebenen Menge des Test-Oligomers, das typischerweise fluoreszierend markiert ist, bei einer Oligomer-Endkonzentration zwischen etwa 10–300 nM inkubiert. Kurz danach, z. B. 10–30 Minuten (bevor eine signifikante Internalisierung des Test-Oligomers erfolgen kann), wird das Verlagerungs-Agens in stufenweise steigenden Konzentrationen zugefügt. Wenn die Testverbindung in der Lage ist, an einen Zelloberflächenrezeptor zu binden, wird beobachtet werden, dass die Verlagerungsverbindung die Test-Verbindung verlagert. Wenn gezeigt wird, dass die Verlagerungsverbindung 50% Verlagerung bei einer Konzentration von 10X der Testverbindungskonzentration oder weniger produziert, wird erachtet, dass die Testverbindung an derselben Erkennungsstelle für das Zelltransportsystem bindet wie die Verlagerungsverbindung.

**[0064]** Ein zweiter Test misst den Zelltransport durch Untersuchen der Fähigkeit der Testverbindung, einen markierten Reporter, z. B. einen Fluoreszenz-Reporter, in Zellen zu transportieren. Die Zellen werden in der Anwesenheit der markierten Testverbindung, die in einer Endkonzentration zwischen etwa 10–300 nM zugefügt wird, inkubiert. Nach einer Inkubation für 30–120 Minuten werden die Zellen z. B. durch Mikroskopie auf die intrazelluläre Markierung untersucht. Das Vorliegen einer signifikanten intrazellulären Markierung ist ein Hinweis, dass die Testverbindung durch erleichterten oder aktiven Transport transportiert wird.

**[0065]** Ein dritter Test beruht auf der Fähigkeit von bestimmten Antisense-Verbindungen, wirksam bakterielles Wachstum zu inhibieren, wenn sie gegen bakterielle 16S- oder 23S-rRNA gerichtet sind. Untersuchungen, die zur Stütze der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurden, zeigen, dass die Inhibition einen aktiven oder erleichterten Transport über bakterielle Zellmembranen erfordert. Die Testverbindung wird mit einer 16S-Zielsequenz hergestellt, von der gezeigt worden ist, dass sie im Inhibieren des bakteriellen Wachstums wirksam ist. Zum Beispiel sind die SEQ ID NOS: 1–3 hierin repräsentative Sequenzen gegen E. coli 16S-rRNA. Die Verbindung wird in steigenden Konzentrationen, typischerweise zwischen 10 nM und 1 mM, zu der wachsenden bakteriellen Kultur zugefügt. Die Fähigkeit, bakterielles Wachstum zu inhibieren, wird aus der Zahl der Zellkolonie-Zellzählungen 24–72 Stunden nach der Zugabe der Testverbindung gemessen. Die Verbindungen, die eine 50% Inhibition bei einer Konzentration zwischen etwa 100–500 nM oder weniger produzieren können, werden als gute Kandidaten für den aktiven Transport angesehen.

**[0066]** Wie durch die Daten in [Fig. 4](#) gezeigt, inhibierten 500 nM PMO-Antisense-Oligomer, das gegen VRE (Vancomycin-resistenten Enterococcus)-16s-rRNA gerichtet ist, die die SEQ ID NO: 92 hat, das Wachstum in VRE um etwa 50%. Es wurde auch beobachtet, dass die Zugabe einer vergleichbar großen Konzentration (50 µM) eines nicht-Zielsequenz-PMO (Antisensesequenz zu c-myc; SEQ ID NO: 139) diese Wirkung im

Wesentlichen nichtig macht, was nahe legt, dass der Transportmechanismus eine begrenzte Kapazität aufweist.

#### D. mRNA-Resistenz gegen RNaseH

**[0067]** Es ist vorgeschlagen worden, dass zwei allgemeine Mechanismen die Inhibierung der Expression durch Antisense-Oligonucleotide bewirken. (Siehe z. B. Agrawal et al, 1990; Bonham et al., 1995; und Boudvillain et al., 1997). Erstens ist ein Heteroduplex, der zwischen dem Oligonucleotid und der mRNA gebildet wird, ein Substrat für RNaseH, was zur Spaltung der mRNA führt. Oligonucleotide, die zu dieser Klasse gehören oder von denen angenommen wird, dass sie dazu gehören, schließen Phosphorthioate, Phosphotriester und Phosphodiester ein (nicht modifizierte „natürliche“ Oligonucleotide). Weil jedoch solche Verbindungen mRNA in einer Oligomer:RNA-Duplexstruktur für eine Proteolyse durch RNaseH und daher den Verlust des Duplex offenlegen würden, sind sie suboptimal; sie sind nicht für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung eingeschlossen. Es ist nicht beobachtet worden, dass eine zweite Klasse von Oligonucleotid-Analogen, genannt „sterische Blocker“ oder alternativ „RNaseH inaktiv“ oder „RNaseH-resistent“, als ein Substrat für RNaseH wirkt, und es wird angenommen, dass sie durch sterische Blockierung von nucleocytoplasmatischem Ziel-RNA-Transport, Spleißung oder Translation wirkt. Diese Klasse schließt Methylphosphonate (Toulme et al., 1996), Morpholin-Oligonucleotide, wie durch die vorliegende Erfindung umfasst, Peptid-Nucleinsäuren (PNA's); 2'-O-Allyl- oder 2'-O-Alkyl-modifizierte Oligonucleotide (Bonham, 1995) und N3'→P5' Phosphoramidate (Gee, 1998; Ding) ein.

**[0068]** Ein Test-Oligomer kann durch Bilden eines RNA-Oligomer-Duplex mit der Testverbindung, dann Inkubieren des Duplex mit RNaseH unter Standard-Testbedingungen, wie in Stein et al. beschrieben, auf seine Fähigkeit, mRNA gegen RNaseH zu schützen, getestet werden. Nach dem Aussetzen gegenüber RNaseH kann das Vorliegen oder Fehlen des intakten Duplex durch Gelelektrophorese oder Massenspektrometrie überwacht werden.

**[0069]** Beim Testen eines Oligomers auf ein Geeignetsein in der vorliegenden Erfindung wird vorzugsweise jede der oben detailliert beschriebenen Eigenschaften erfüllt. Es wird anerkannt, dass die „im Wesentlichen ungeladene“ Eigenschaft von Natur aus erfüllt wird, wo die Bindungen ungeladen sind, und die Zielsequenz-Komplementarität wird durch Basensequenz-Design erreicht. Daher wird ein Oligomer vorzugsweise hinsichtlich (i) seines T<sub>m</sub>-Werts in Bezug auf die Ziel-RNA bei einer Duplexlänge von vorzugsweise zwischen 12–20 Basenpaaren, (ii) seiner Fähigkeit, durch aktiven oder erleichterten Transport über Zellmembranen transportiert zu werden, und (iii) seiner Fähigkeit, RNA-Proteolyse durch RNaseH in Duplex-Form zu verhindern, getestet.

**[0070]** Die antibakterielle Wirksamkeit eines vorgegebenen Antisense-Oligomers kann weiter durch Screening-Verfahren, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, bewertet werden. Zum Beispiel kann das Oligomer mit einer bakteriellen Kultur in vitro inkubiert und die Wirkung auf die 16S-Ziel-RNA durch Überwachen (1) der Heteroduplex-Bildung mit der Zielsequenz und/oder Nicht-Zielsequenzen unter Verwendung von Vorgehensweisen, die Fachleuten bekannt sind, z. B. eines elektrophoretischen Gel-Mobilitätstests; (2) der Menge der 16S-mRNA, bestimmt durch Standardtechniken wie RT-PCR oder Northern-Blot; (3) der Menge der bakteriellen Proteinproduktion, bestimmt durch Standardtechniken wie ELISA oder Western-Blot-Verfahren; oder (4) der Menge des bakteriellen Wachstums in vitro sowohl für Bakterien, von denen bekannt ist, dass sie die 16S-rRNA-Sequenz haben, gegen die ein bestimmtes Antisense-Oligomer gerichtet ist, als auch Bakterien, von denen nicht vorhergesagt wird, dass sie die 16S-rRNA-Zielsequenz haben, bewertet werden.

**[0071]** Kandidaten-Antisense-Oligomere können auch gemäß gut bekannten Verfahren auf akute und chronische zelluläre Toxizität wie die Wirkung auf Protein- und DNA-Synthese, gemessen durch Inkorporation von <sup>3</sup>H-Leucin beziehungsweise <sup>3</sup>H-Thymidin, bewertet werden. Zusätzlich werden verschiedene Kontroll-Oligonucleotide, z. B. ein oder mehrere Kontroll-Oligonucleotid(e) wie Sense-, Nonsense- oder verstreute („scrambled“) Antisense-Sequenzen oder Sequenzen, die fehlgepaarte Basen enthalten, im Allgemeinen in den Bewertungsprozess eingeschlossen, um die Spezifität der Bindung der Kandidaten-Antisense-Oligomere zu bestätigen. Die Ergebnisse von solchen Tests ermöglichen die Unterscheidung von spezifischen Wirkungen der Antisense-Inhibition der Genexpression von wahlloser Suppression. (Siehe z. B. Bennett et al., 1995). Sequenzen können, wie benötigt, modifiziert werden, um nicht-spezifische Bindung von Antisense-Oligomeren an Nicht-Zielsequenzen z. B. durch Ändern der Länge oder des Grads der Komplementarität zu der Zielsequenz zu limitieren.

## III. Ungeladene Oligonucleotid-Analoga

**[0072]** Ein Beispiel einer ungeladenen Bindung, die in Oligonucleotid-Analogen der Erfindung verwendet werden kann, ist in [Fig. 3](#) gezeigt. (Wie unten angemerkt, kann auch eine kleine Zahl von geladenen Bindungen, d. h. geladenes Phosphoramidat, in die Oligomere inkorporiert werden.) In [Fig. 3](#) repräsentiert B eine Purin- oder Pyrimidin-basenpaarbildende Einheit, die wirksam ist, durch basenspezifische Wasserstoffbindung an eine Base in einem Polynucleotid, vorzugsweise ausgewählt aus Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil, zu binden. Die Bindungen verbinden Nucleotid-Untereinheiten, wobei jede aus einem 6-Mitglieder-Ring besteht, der eine basenpaarbildende Einheit trägt, die wirksam ist, mittels Watson-Crick-Basenpaarung an eine entsprechende Nucleotidbase in der bakteriellen Nucleinsäuresequenz zu binden.

**[0073]** Die Oligomerstruktur der vorliegenden Erfindung verwendet Morpholin-basierende Untereinheiten, die basenpaarbildende-Einheiten tragen, verbunden durch ungeladene Bindungen, wie oben dargelegt. Besonders bevorzugt ist ein im Wesentlichen ungeladenes Morpholin-Oligomer, wie durch die Phosphordiamidat-verknüpfte Verbindung, die in [Fig. 3](#) gezeigt ist, illustriert. Morpholin-Oligonucleotide, einschließlich Antisense-Oligomere, werden zum Beispiel in den gemeinsam im Besitz befindlichen US-Patenten Nr. 5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,185,444, 5,521,063 und 5,506,337 detailliert angeführt. Wünschenswerte chemische Eigenschaften der Morpholin-basierenden Untereinheiten sind die Fähigkeit, in einer oligomeren Form durch stabile, ungeladene Gerüst-Bindungen verknüpft zu sein, die Fähigkeit des so gebildeten Polymers, mit einer Komplementärbasen-Zielnucleinsäure, einschließlich einer Ziel-RNA, mit hohem T<sub>m</sub>-Wert zu hybridisieren, sogar mit Oligomeren, die so kurz wie 10–14 Basenpaare sind, die Fähigkeit des Oligomers, aktiv in Säugerzellen transportiert zu werden, und die Fähigkeit des Oligomer:RNA-Heteroduplex, einem RNase-Abbau zu widerstehen.

**[0074]** Beispielhafte Gerüststrukturen für Antisense-Oligonucleotide der Erfindung schließen die Morpholin-Untereinheitstypen ein, die in den [Fig. 1A–D](#) gezeigt sind, wobei jeder durch eine ungeladene, Phosphor-enthaltende Untereinheitsbindung verknüpft ist. In diesen Figuren kann der Anhang der X-Einheit von Phosphor jeder der folgenden sein: Fluor; ein Alkyl oder substituiertes Alkyl; ein Alkoxy oder substituiertes Alkoxy; ein Thioalkoxy oder ein substituiertes Thioalkoxy; oder ein nicht-substituierter, monosubstituierter oder disubstituierter Stickstoff, einschließlich zyklischer Strukturen. Alkyl, Alkoxy und Thioalkoxy schließen vorzugsweise 1-6 Kohlenstoffatome und mehr bevorzugt 1-4 Kohlenstoffatome ein. Monosubstituierter oder disubstituierter Stickstoff bezeichnet vorzugsweise eine niedrigere Alkyl-Substitution, und die zyklischen Strukturen sind vorzugsweise Stickstoff-Heterozyklen mit 5 bis 7 Mitgliedern, die optionell 1-2 zusätzliche Heteroatome enthalten, ausgewählt von Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel. Z ist Schwefel oder Sauerstoff und ist vorzugsweise Sauerstoff.

**[0075]** [Fig. 1](#) zeigt eine Phosphor-enthaltende Bindung, die das Wiederholungseinheit-Gerüst aus fünf-Atomen, das in [Fig. 2A](#) gezeigt ist, bildet, wobei die Morpholin-Ringe durch eine 1-Atom-Phosphoramid-Bindung verbunden sind.

**[0076]** Die Untereinheit B in [Fig. 1B](#) ist für Wiederholungseinheit-Gerüste aus 6 Atomen gestaltet, wie in [Fig. 2B](#) gezeigt. In [Fig. 1B](#) kann das Atom Y<sub>1</sub>, das den 5'-Morpholin-Kohlenstoff mit der Phosphorgruppe verknüpft, Schwefel, Stickstoff, Kohlenstoff oder vorzugsweise Sauerstoff sein. Die X- und Z-Einheiten sind, wie oben definiert. Besonders bevorzugte Morpholin-Oligonucleotide schließen jene ein, die aus Morpholin-Untereinheitsstrukturen mit der Form, wie in [Fig. 2B](#) gezeigt, zusammengesetzt sind, wobei X = NH<sub>2</sub> oder N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Y<sub>1</sub> Sauerstoff ist und Z Sauerstoff ist.

**[0077]** Die Untereinheiten C–D in den [Fig. 1C–D](#) sind für Gerüste mit einer Einheiten-Länge von 7 Atomen gestaltet, wie für Strukturen in den [Fig. 2C](#) und D gezeigt. In Struktur C ist die X-Einheit wie in Struktur B, und die Einheit Y<sub>2</sub> kann Methylen, Schwefel oder vorzugsweise Sauerstoff sein. In Struktur D sind die X- und Y<sub>1</sub>-Einheiten wie in Struktur B. In allen Untereinheiten, die in den [Fig. 1](#) und 2 gezeigt sind, ist jedes Pi und Pj eine Purin- oder Pyrimidin-basenpaarbildende Einheit, die wirksam ist, um durch basenspezifische Wasserstoffbindung an eine Base in einem Polynucleotid zu binden, und wird vorzugsweise aus Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil ausgewählt.

**[0078]** Wie oben angemerkt, kann das im Wesentlichen ungeladene Oligomer vorteilhafterweise eine limitierte Zahl von geladenen Bindungen einschließen, z. B. bis zu etwa 1 pro je 5 ungeladenen Bindungen. In den Morpholin-Oligomeren kann solch eine geladene Bindung eine Bindung sein, wie durch jede der [Fig. 2A–D](#), vorzugsweise [Fig. 2B](#) repräsentiert, wobei X Oxid (-O<sup>-</sup>) oder Sulfid (-S<sup>-</sup>) ist.

**[0079]** Die Antisense-Verbindungen der Erfindung können durch schrittweise Festphasen-Synthese unter Anwendung von Verfahren, die in den oben zitierten Bezugnahmen detailliert beschrieben sind, synthetisiert werden. Die Sequenz von Untereinheits-Anfügungen wird durch die ausgewählte Basensequenz bestimmt (siehe Abschnitte IID und IV unten). In manchen Fällen kann es wünschenswert sein, zusätzliche chemische Einheiten an die Oligomer-Verbindungen anzufügen, z. B. um die Pharmakokinetik der Verbindung zu verstärken oder um das Einfangen oder den Nachweis der Verbindung zu ermöglichen. Solch eine Einheit kann gemäß Standard-Syntheseverfahren typischerweise kovalent an das 5'- oder 3'-Ende des Oligomers angefügt werden. Zum Beispiel kann die Zugabe einer Polyethylenglycol-Einheit oder eines anderen hydrophilen Polymers, z. B. eines, das 10–100 Polymer-Untereinheiten hat, im Verstärken der Löslichkeit nützlich sein. Eine oder mehrere geladene Gruppe(n), z. B. anionische geladene Gruppen wie ein organisches Salz, können die Zellaufnahme verstärken. Eine Reportereinheit wie Fluorescein oder eine radioaktiv markierte Gruppe kann zu Zwecken des Nachweises angeheftet werden. Alternativ kann die Reportermarkierung, die an das Oligomer angeheftet ist, ein Ligand wie ein Antigen oder Biotin sein, der zum Binden eines markierten Antikörpers oder von Streptavidin in der Lage ist. Im Selektieren einer Einheit für das Anheften oder die Modifizierung eines Antisense-Oligomers, ist es natürlich allgemein wünschenswert, chemische Verbindungen von Gruppen auszuwählen, die biokompatibel sind und wahrscheinlich durch ein Subjekt ohne unerwünschte Nebenwirkungen toleriert werden.

#### IV. Beispielhafte bakterielle Ziele

**[0080]** *Escherichia coli* (*E. coli*) ist ein Gram-negatives Bakterium, das Teil der normalen Flora des Gastrointestinaltrakts ist. Es gibt Hunderte von Stämmen von *E. coli*, wobei die meisten davon harmlos sind und im Gastrointestinaltrakt von gesunden Menschen und Tieren leben. Derzeit gibt es vier anerkannte Klassen von enterovirulenten *E. coli* (die „EEC-Gruppe“), die Gastroenteritis in Menschen verursachen. Unter diesen gibt es enteropathogene (EPEC) Stämme und jene, deren Virulenz-Mechanismus mit der Exkretion von typischen *E. coli*-Enterotoxinen in Beziehung stehen. Solche Stämme von *E. coli* können verschiedene Krankheiten, einschließlich jener, die mit einer Infektion des Gastrointestinaltrakts und des Harntrakts, einer Septikämie, Pneumonie und Meningitis assoziiert sind, hervorrufen. Antibiotika sind gegen manche Stämme nicht wirksam und verhindern nicht notwendigerweise ein Wiederauftreten einer Infektion.

**[0081]** Zum Beispiel wird geschätzt, dass der *E. coli*-Stamm 0157:H7 10000 bis 20000 Infektionsfälle jährlich in den Vereinigten Staaten verursacht (Federal Centers for Disease Control and Prevention). Hämorrhagische Colitis ist der Name der akuten Krankheit, die durch *E. coli* 0157:H7 verursacht wird. Vorschulkinder und die älteren Menschen weisen das größte Risiko für schwere Komplikationen auf. Es wurde vor kurzem berichtet, dass der *E. coli*-Stamm 0157:H7 die Todesursache von vier Kindern war, die zu kurz gekochte Hamburger von einem Fastfood-Restaurant im pazifischen Nordwesten aßen.

**[0082]** *Salmonella typhimurium* sind Gram-negative Bakterien, die verschiedene Zustände verursachen, die klinisch von lokalisierten Gastrointestinal-Infektionen und Gastroenteritis (Diarrhöe, Bauchkrämpfe und Fieber) zu Salmonellenenteritis (einschließlich typhoides Fieber) reichen, was schwere systemische Krankheiten sind. Eine *Salmonella*-Infektion verursacht auch wesentliche Verluste bei Nutztieren.

**[0083]** Typisch für Gram-negative Bazillen enthält die Zellwand von *Salmonella* spp. eine komplexe Lipopolysaccharid(LPS)-Struktur, die bei der Lyse der Zelle freigesetzt wird und als ein Endotoxin wirken kann, das zu der Virulenz des Organismus beiträgt.

**[0084]** Kontaminierte Lebensmittel sind der Hauptweg der Übertragung einer nicht-typhoiden Salmonellen-Infektion aufgrund der Tatsache, dass *Salmonella* in Fleisch und tierischen Produkten überlebt, die nicht vollständig gekocht sind. Die häufigsten tierischen Quellen sind Hühner, Puten, Schweine und Kühe, zusätzlich zu zahlreichen anderen Haus- und Wildtieren. Die Epidemiologie von typhoidem Fieber und anderen Salmonellenenteritis-Arten, die durch *Salmonella* spp. verursacht werden, ist mit Wasser assoziiert, das mit menschlichen Fäkalien kontaminiert ist.

**[0085]** Impfstoffe für Bauchtyphus sind erhältlich und sind teilweise wirksam; es sind jedoch keine Impfstoffe gegen eine nicht-typhoide *Salmonella*-Infektion erhältlich. Nicht-typhoide Salmonellose wird durch hygienische Schlachtpraktiken und ausgiebiges Kochen und Kühlen von Lebensmitteln kontrolliert. Antibiotika sind für eine systemische Krankheit indiziert, und Ampicillin ist mit einem gewissen Erfolg verwendet worden. Bei Patienten in Behandlung mit übermäßigen Mengen von Antibiotika, Patienten in Behandlung mit immunsuppressiven Arzneistoffen nach einer Magenoperation und in Patienten mit hämolytischer Anämie, Leukämie, Lymphom oder AIDS bleibt jedoch eine *Salmonella*-Infektion ein medizinisches Problem.

**[0086]** *Pseudomonas* spp. sind motile, Gram-negative Stäbchen, die klinisch wichtig sind, weil sie gegen die meisten Antibiotika resistent sind, und sind eine Hauptursache von Spital-erworbenen (nosokomialen) Infektionen. Eine Infektion ist am häufigsten in: abwehrgeschwächten Individuen, Verbrennungsopferten, Individuen mit Beatmungsgeräten, Individuen mit Dauerkathetern, Benutzern von IV-Narkotika und Individuen mit chronischer Lungenkrankheit (z. B. cystischer Fibrose). Obwohl eine Infektion in gesunden Individuen selten ist, kann sie an vielen Stellen erfolgen und zu Harntrakts-Infektionen, Sepsis, Pneumonie, Pharyngitis und zahlreichen anderen Problemen führen, und eine Behandlung versagt oft mit größerer signifikanter Mortalität.

**[0087]** *Vibrio cholerae* ist ein Gram-negatives Stäbchen, das Menschen infiziert und Cholera verursacht, eine Krankheit, die durch schlechte Hygiene verbreitet wird, was in kontaminierten Wasserversorgungen resultiert. *Vibrio cholerae* kann den menschlichen Dünndarm kolonialisieren, wo es ein Toxin produziert, das den Ionentransport über die Mukosa zerstört, was zu Diarrhöe und Wasserverlust führt. Individuen, die mit *Vibrio cholerae* infiziert sind, benötigen eine Rehydrierung entweder intravenös oder oral mit einer Lösung, die Elektrolyte enthält. Die Krankheit ist im Allgemeinen selbst-limitierend; es kann jedoch Tod durch Dehydrierung und Verlust von essenziellen Elektrolyten erfolgen. Es ist gezeigt worden, dass Antibiotika wie Tetracyclin den Verlauf der Krankheit verkürzen, und orale Impfstoffe sind derzeit in Entwicklung.

**[0088]** *Neisseria gonorrhoea* ist ein Gram-negativer Coccus, der das verursachende Agens der häufig sexuell übertragenen Krankheit Gonorrhöe ist. *Neisseria gonorrhoeae* kann seine Oberflächen-Antigene variieren, was die Entwicklung einer Immunität gegen eine Reinfektion verhindert. Beinahe 750000 Fälle von Gonorrhöe werden jährlich in den Vereinigten Staaten berichtet, mit geschätzten zusätzlichen 750000 nicht-berichteten Fällen jährlich, vorwiegend unter Teenagern und jungen Erwachsenen. Ampicillin, Amoxicillin oder ein gewisser Typ von Penicillin pflegen für die Behandlung der Gonorrhöe empfohlen zu werden. Die Häufigkeit einer Penicillin-resistenten Gonorrhöe ist jedoch steigend, und neue Antibiotika, die durch Injektion verabreicht werden, z. B. Ceftriaxon oder Spectinomycin, werden jetzt verwendet, um die meisten Gonococcal-Infektionen zu behandeln.

**[0089]** *Staphylococcus aureus* ist ein Gram-positiver Coccus, der normalerweise die menschliche Nase kolonisiert und manchmal auf der Haut gefunden wird. *Staphylococcus* kann Infektionen des Blutstroms, Pneumonie und Infektionen an chirurgischen Stellen in Krankenhauseinrichtungen bewirken (d. h. nosokomiale Infektionen). *Staph. aureus* kann eine schwere Lebensmittelvergiftung verursachen, und viele Stämme wachsen auf Lebensmitteln und produzieren Exotoxine. Eine *Staphylococcus*-Resistenz gegen übliche Antibiotika, z. B. Vancomycin, ist in den Vereinigten Staaten und Übersee als eine Hauptherausforderung für die öffentliche Gesundheit sowohl in Gemeinschafts- als auch Krankenhauseinrichtungen aufgetreten. Kürzlich ist ein Vancomycin-resistentes *Staph. aureus*-Isolat auch in Japan identifiziert worden.

**[0090]** *Mycobacterium tuberculosis* ist ein Gram-positives Bakterium, das das verursachende Agens für Tuberkulose, eine manchmal lähmende und tödliche Krankheit, ist. Tuberkulose ist global im Ansteigen und ist die führende Todesursache einer einzelnen infektiösen Krankheit (mit einer derzeitigen Sterberate von drei Millionen Menschen pro Jahr). Sie kann einige Organe des menschlichen Körpers, einschließlich des Gehirns, der Nieren und der Knochen, betreffen; Tuberkulose befällt jedoch am häufigsten die Lungen.

**[0091]** In den Vereinigten Staaten sind ungefähr 10 Millionen Individuen mit *Mycobacterium tuberculosis* infiziert, angezeigt durch positive Hauttests, mit ungefähr 26000 neuen Fällen einer aktiven Krankheit pro Jahr. Der Anstieg der Tuberkulose(TB)-Fälle ist mit HIV/AIDS, Obdachlosigkeit, Drogenmissbrauch und Immigration von Personen mit aktiven Infektionen assoziiert worden. Derzeitige Behandlungsprogramme für Arzneistoff-empfindliche TB involvieren die Aufnahme von zwei oder vier Arzneistoffen (z. B. Isoniazid, Rifampin, Pyrazinamid, Ethambutol oder Streptomycin) für einen Zeitraum von sechs bis neun Monaten, weil nicht alle TB-Keime durch einen einzelnen Arzneistoff zerstört werden können. Zusätzlich ist die Beobachtung von Arzneistoff-resistenten und Mehrfacharzneistoff-resistenten Stämmen von *Mycobacterium tuberculosis* im Steigen.

**[0092]** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ist ein mikro-aerophiler, Gram-negativer, langsam wachsender, begeißelter Organismus mit einer spiraligen oder S-förmigen Morphologie, der die Auskleidung des Magens infiziert. *H. pylori* ist ein menschliches Magen-Pathogen, das mit chronischer oberflächlicher Gastritis, Magengeschwür-Erkrankung und chronischer atrophischer Gastritis, die zu Magen-Adenokarzinom führt, assoziiert ist. *H. pylori* ist eine der häufigsten chronischen bakteriellen Infektionen in Menschen und wird in über 90% der Patienten mit aktiver Gastritis gefunden. Die derzeitige Behandlung schließt eine Dreifach-Arzneistoff-Therapie mit Bismut, Metronidazol und entweder Tetracyclin oder Amoxicillin ein, was *H. pylori* in den meisten Fällen ausrottet. Probleme mit der Dreifach-Therapie schließen die Patienten-Zustimmung, Nebenwirkungen und Me-

tronidazol-Resistenz ein. Alternative Behandlungspläne einer Zweifach-Therapie, die vielversprechend sind, sind Amoxicillin plus Metronidazol oder Omeprazol plus Amoxicillin.

**[0093]** *Streptococcus pneumoniae* ist ein Gram-positiver Coccus und eine der häufigsten Ursachen von bakterieller Pneumonie so wie von Mittelohrinfektionen (Otitis media) und Meningitis. Jedes Jahr machen Pneumococccen-Krankheiten in den Vereinigten Staaten ungefähr 50000 Fälle von Bakteriämie; 3000 Fälle von Meningitis; 100000–135000 Hospitalisierungen; und 7 Millionen Fälle von Otitis media aus. Pneumococccen-Infektionen verursachen in den Vereinigten Staaten geschätzte 40000 Todesfälle jährlich. Kinder im Alter unter 2 Jahre, Erwachsene im Alter über 65 Jahre, Personen jeden Alters mit zugrundeliegenden medizinischen Zuständen, einschließlich z. B. kongestiver Herzerkrankung, Diabetes, Emphysem, Leberkrankheit, Sichelzellen-Anämie, HIV und jener, die unter besonderen Umweltbedingungen, z. B. in Altersheimen und Dauerpflegeeinrichtungen leben, weisen das größte Risiko für eine Infektion auf.

**[0094]** Arzneistoff-resistente *S. pneumoniae*-Stämme sind in den Vereinigten Staaten häufig geworden, wobei viele Penicillin-resistente Pneumococccen auch resistent gegen andere antimikrobielle Arzneistoffe wie Erythromycin oder Trimethoprim-Sulfamethoxazol sind.

**[0095]** *Treponema palladium* ist eine Spirochäte, die Syphilis verursacht. *T. pallidum* ist ausschließlich ein Pathogen, das Syphilis, Frambösie und nicht-venerische endemische Syphilis oder Pinta verursacht. *Treponema pallidum* kann nicht *in vitro* gezüchtet werden und repliziert in der Abwesenheit von Säugerzellen. Die anfängliche Infektion verursacht ein Geschwür an der Stelle der Infektion; die Bakterien bewegen sich jedoch quer durch den Körper, wobei mit der Zeit viele Organe beschädigt werden. In ihren späten Stadien kann unbehandelte Syphilis, wenngleich nicht ansteckend, schwere Herz-Abnormalitäten, mentale Störungen, Blindheit, andere neurologische Probleme und Tod verursachen.

**[0096]** Syphilis wird normalerweise mit Penicillin, das durch Injektion verabreicht wird, behandelt. Andere Antibiotika sind für Patienten, die gegen Penicillin allergisch sind oder die nicht auf die üblichen Dosen von Penicillin antworten, verfügbar. Eine korrekte Behandlung wird die Krankheit in allen Stadien der Syphilis heilen, aber bei später Syphilis kann eine Schädigung, die bereits an Körperorganen erfolgt ist, nicht rückgängig gemacht werden.

**[0097]** *Chlamydia trachomatis* ist die häufigste bakterielle, sexuell übertragene Krankheit in den Vereinigten Staaten, und es wird geschätzt, dass jedes Jahr 4 Millionen neue Fälle auftreten. Die höchsten Raten der Infektion sind bei 15- bis 19-Jährigen. *Chlamydia* ist eine Hauptursache von nicht-Gonococccen-Urethritis (NGU), Cervicitis, bakterieller Vaginitis und Becken-Entzündungskrankheit (PID). Chlamydien-Infektionen können sehr milde Symptome oder gar keine Symptome haben; wenn sie jedoch unbehandelt bleiben, können *Chlamydia*-Infektionen zu einer schweren Schädigung der Reproduktionsorgane insbesondere in Frauen führen. Antibiotika wie Azithromycin, Erythromycin, Ofloxazin, Amoxicillin oder Doxycyclin werden typischerweise verschrieben, um eine *Chlamydia*-Infektion zu behandeln.

**[0098]** *Bartonella henselae*. Katzenkratzfieber (CSF) oder Katzenkratzkrankheit (CSD) ist eine Krankheit von Menschen, die durch Ausgesetztsein gegenüber Katzen erworben wird und durch ein Gram-negatives Stäbchen verursacht wird, das ursprünglich *Rochalimaea henselae* genannt wurde und derzeit als *Bartonella henselae* bekannt ist. Symptome schließen Fieber und geschwollene Lymphknoten ein. CSF ist im Allgemeinen eine relativ gutartige, selbst-limitierende Krankheit in Menschen; eine Infektion mit *Bartonella henselae* kann jedoch deutliche klinische Symptome in abwegeschwächten Menschen produzieren, einschließlich akuter fieberhafter Krankheit mit Bakteriämie, bazillärer Angiomatose, Peliose-Hepatitis, bazillärer Splenitis und anderer chronischer Krankheits-Manifestationen wie AIDS-Encephalopathie.

**[0099]** Die Krankheit wird mit Antibiotika wie Doxycyclin, Erythromycin, Rifampin, Penicillin, Gentamycin, Ceftriaxon, Ciprofloxacin und Azithromycin behandelt.

**[0100]** *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) ist eine Familie von Gram-negativen Bakterien; sechs Typen davon sind bekannt, wobei die am meisten mit *H. influenzae* in Beziehung stehende Krankheit durch den Typ B oder „HIB“ verursacht wird. Bis ein Impfstoff für HIB entwickelt wurde, war HIB eine häufige Ursache von Otitis media, Sinusinfektionen, Bronchitis, die häufigste Ursache von Meningitis und ein häufiger Übeltäter in Fällen von Pneumonie, septischer Arthritis (Gelenksinfektionen), Cellulitis (Infektionen von Weichgeweben) und Pericarditis (Infektionen der Membran, die das Herz umgibt). Das *H. influenzae* Typ B-Bakterium ist in Menschen weitverbreitet und lebt normalerweise im Rachen und der Nase, ohne eine Krankheit zu verursachen. Nicht geimpfte Kinder unter 5 Jahren weisen ein Risiko für eine HIB-Krankheit auf. Meningitis und andere schwere

Infektionen, die durch eine H. influenza-Infektion verursacht werden, können zu einer Hirnschädigung oder zum Tod führen.

**[0101]** *Shigella dysenterae* (*Shigella dys.*) ist ein Gram-negatives Stäbchen, das Dysenterie verursacht. Im Colon treten die Bakterien in Mukosazellen ein und teilen sich in den Mukosazellen, was in einer überschießenden entzündlichen Antwort resultiert. Eine *Shigella*-Infektion kann eine schwere Diarrhöe verursachen, die zur Dehydratation führen kann und für die sehr Jungen, sehr Alten oder chronisch Kranken gefährlich sein kann. *Shigella dys.* bildet ein starkes Toxin (Shiga-Toxin), das cytotoxisch, enterotoxisch und neurotoxisch ist und als ein Inhibitor der Proteinsynthese wirkt. Eine Resistenz gegen Antibiotika wie Ampicillin und TMP-SMX hat sich entwickelt; dennoch bleibt eine Behandlung mit neueren, teureren Antibiotika wie Ciprofloxacin, Norfloxacin und Enoxacin wirksam.

**[0102]** *Enterococcus faecium*. Enterococci sind ein Bestandteil der normalen Flora des Gastrointestinal- und weiblichen Urogenitaltrakts, dennoch weisen neue Studien darauf hin, dass pathogene Enterococci direkt in der Krankenhauseinrichtung übertragen werden können. (Siehe z. B. Boyce et al., *J Clin Microbiol* 32, 1148–53, 1994). Enterococci sind als eine Ursache einer nosokomialen Infektion erkannt worden, und manche Stämme sind resistent gegen mehrere antimikrobielle Arzneistoffe. Die häufigsten Enterococci-assoziierten nosokomialen Infektionen sind Harntraktsinfektionen, postoperative Infektionen und Bakteriämie (Murray BE, *Clin Microbiol* 3, 46–65, Rev. 1990; Moellering RC Jr., *Clin Infect Dis* 14, 1173–8, 1992; Schaberg DR et al., *Am J Med* 91(Ergänz 3B), 72S–75S, 1991).

**[0103]** Vancomycin ist seit den späten 1970ern ausgiebig verwendet worden, um eine *Enterococcus*-Infektion zu behandeln. In letzter Zeit ist von einem schnellen Ansteigen in der Häufigkeit einer Infektion und Kolonialisierung mit Vancomycin-resistenten Enterococci (VRE) berichtet worden. Die beobachtete Resistenz ist aufgrund (1) des Fehlens einer wirksamen antimikrobiellen Therapie gegen VRE-Infektionen, weil die meisten VRE auch gegen Arzneistoffe resistent sind, die vorher verwendet wurden, um solchen Infektionen zu behandeln, d. h. Penicillin und Aminoglycoside (CDC. *MMWR* 42: 597–9, 1993; Handwerker, et al., *Clin Infect Dis* 16, 750–5, 1993); und (2) der Möglichkeit, dass die Vancomycin-Resistenz-Gene, die in VRE vorliegen, auf andere Gram-positive Mikroorganismen übertragen werden können, beunruhigend.

**[0104]** Eine Resistenz gegen Vancomycin und andere Glycopeptid-Antibiotika ist mit der Synthese eines modifizierten Zellwand-Vorläufers assoziiert worden, der mit D-Lactat, das eine niedrigere Affinität für Antibiotika wie Vancomycin hat, endet.

**[0105]** *Listeria* ist eine Gattung von Gram-positiven, motilen Bakterien, die in menschlichen und tierischen Fäkalien gefunden werden. *Listeria monocytogenes* verursacht solche Krankheiten wie Meningoencephalitis und Meningitis. In Rindern und Schafen verursacht eine *Listeria*-Infektion Encephalitis und spontanen Abort.

**[0106]** Veterinärmedizinische Anwendungen. Eine gesunde Mikroflora im Gastrointestinaltrakt von Nutztieren ist von entscheidender Wichtigkeit für die Gesundheit und entsprechende Produktion von assoziierten Lebensmittelprodukten. Wie bei Menschen enthält der Gastrointestinaltrakt eines gesunden Tiers zahlreiche Typen von Bakterien (d. h. *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella* spp.), die miteinander in ökologischem Gleichgewicht leben. Dieses Gleichgewicht kann durch eine Änderung in der Nahrung, Stress oder als Antwort auf ein Antibiotikum oder eine andere therapeutische Behandlung gestört werden, was in bakteriellen Krankheiten in den Tieren resultiert, die im Allgemeinen durch Bakterien wie *Salmonella*, *Campylobacter*, *Enterococci*, *Tularemia* und *E. coli* verursacht werden. Eine bakterielle Infektion in diesen Tieren erfordert oft eine therapeutische Intervention, die Behandlungskosten hat sowie oft mit einem Absinken in der Produktivität assoziiert ist.

**[0107]** Als ein Ergebnis werden Nutztiere routinemäßig mit Antibiotika behandelt, um das Gleichgewicht der Flora im Gastrointestinaltrakt beizubehalten. Die Nachteile dieses Ansatzes sind die Entwicklung von Antibiotikum-resistenten Bakterien und das Übertragen von solchen Antibiotika in resultierende Nahrungsmittelprodukte für den menschlichen Verzehr.

#### V. Beispielhafte 16S-rRNA-Antisense-Oligomere

**[0108]** In einer Ausführungsform werden die Antisense-Oligomere der Erfindung gestaltet, um unter physiologischen Bedingungen an eine Region einer bakteriellen 16S-rRNA-Nucleinsäuresequenz mit einem T<sub>m</sub>-Wert von im Wesentlichen mehr als 37°C, z. B. mindestens 50°C und vorzugsweise 60°C–80°C zu hybridisieren. Das Oligomer ist gestaltet, um eine hohe Bindungsaffinität an die Nucleinsäure zu haben, und kann 100% kom-

plementär zu der 16S-rRNA-Nucleinsäurezielsequenz sein, oder es kann Fehlpaarungen einschließen, wie oben weiter beschrieben.

**[0109]** In verschiedenen Aspekten liefert die Erfindung ein Antisense-Oligomer, das eine Nucleinsäuresequenz hat, die wirksam ist, um stabil und spezifisch an eine Zielsequenz zu binden, die aus der Gruppe ausgewählt wurde, bestehend aus 16S-rRNA-Sequenzen, die ein oder mehrere der folgenden Charakteristika aufweisen: (1) eine Sequenz, die in einer doppelsträngigen Region einer 16s-rRNA gefunden wird, z. B. das Peptidyltransferase-Zentrum, die Alpha-Sarcinschleife und die mRNA-Bindungsregion der 16S-rRNA-Sequenz; (2) eine Sequenz, die in einer einzelsträngigen Region einer bakteriellen 16s-rRNA gefunden wird; (3) eine Sequenz, die für einen bestimmten Stamm einer vorgegebenen Spezies von Bakterien spezifisch ist, d. h. einem Stamm von *E. coli*, der mit einer Lebensmittelvergiftung assoziiert ist; (4) eine Sequenz, die spezifisch für eine bestimmte Spezies von Bakterien ist; (5) eine Sequenz, die zwei oder mehreren Spezies von Bakterien gemein ist; (6) eine Sequenz, die zwei verwandten Gattungen von Bakterien gemein ist (d. h. bakteriellen Gattungen mit einem ähnlichen phylogenetischen Ursprung); (7) eine Sequenz, die allgemein unter Gram-negativen bakteriellen 16S-rRNA-Sequenzen konserviert ist; (6) eine Sequenz, die allgemein unter Gram-positiven bakteriellen 16S-rRNA-Sequenzen konserviert ist; oder (7) eine Konsensus-Sequenz für bakterielle 16S-rRNA-Sequenzen im Allgemeinen.

**[0110]** Beispielhafte Bakterien und die assoziierten GenBank-Zugangsnummern für 16S-rRNA-Sequenzen werden unter in Tabelle 1 geliefert.

Tabelle 1

Organismus	GenBank-Bezugnahme für 16S rRNA	SEQ ID NO:
<i>Escherichia coli</i>	X80725	1
<i>Salmonella thyphimurium</i>	U88545	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF170358	3
<i>Vibrio cholera</i>	AF118021	4
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	X07714	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	Y15856	6
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	X52917	7
<i>Helicobacter pylori</i>	M88157	8
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	AF003930	9
<i>Treponema palladium</i>	AJ010951	10
<i>Chlamydia trachomatis</i>	D85722	11
<i>Bartonella henselae</i>	X89208	12
<i>Hemophilis influenza</i>	M35019	13
<i>Shigella dysenteriae</i>	X96966	14

**[0111]** Es wird verstanden werden, dass ein Fachmann leicht geeignete Ziele für Antisense-Oligomere bestimmen und Antisense-Oligomere unter Verwendung von auf dem Fachgebiet bekannten Techniken gestalten und synthetisieren kann. Ziele können durch Erhalten der Sequenz einer 16S- oder 23S-Zielnucleinsäure von Interesse (z. B. von GenBank) und Ausrichten derselben mit anderen 16S- oder 23S-Nucleinsäuresequenzen unter Verwendung von zum Beispiel des MacVector 6.0-Programms, eines ClustalW-Algorithmus, der BLOSUM 30-Matrix und von Standardparametern, die eine offene Lücken-Strafe von 10 und eine ausgedehnte Lücken-Strafe von 5.0 für Nucleinsäure-Ausrichtungen einschließen, identifiziert werden. Eine Ausrichtung kann auch unter Verwendung des Lasergene99 MegAlign Multiple Alignment-Programms mit einem ClustalW-Algorithmus, der unter Standardparametern laufen gelassen wird, ausgeführt werden.

**[0112]** Zum Beispiel kann ein Fachmann in Anbetracht der in Tabelle 1 gelieferten 16s-rRNA-Sequenzen und anderer 16s-rRNA-Sequenzen, die in GenBank erhältlich sind, leicht die 16s-rRNA-Sequenzen von Interesse ausrichten und bestimmen, welche Sequenzen unter einem oder mehreren verschiedenen Bakterien konserviert sind, und jene bestimmen, die spezifisch für ein Bakterium oder mehrere bestimmte Bakterien sind. Eine ähnliche Ausrichtung kann an 23S-rRNA-Sequenzen durchgeführt werden.

**[0113]** Als eine Illustration wurden die 16S-rRNA-Sequenzen von den Organismen, die in Tabelle 1 gezeigt sind, unter Verwendung des Lasergene 99 MegAlign Multiple Alignment-Programms mit einem ClustalW-Algorithmus und Standardparametern ausgerichtet. Die Tabellen 2–5 zeigen beispielhafte Antisense-Oligomere zu der 16S-rRNA dieser bakteriellen Spezies, einschließlich Sequenzen, die gegen individuelle Bakterien, mehrere Bakterien und Breitspektrumsequenzen gerichtet sind. Diese Oligomere wurden von den Sequenzen in Tabelle 1 und von der Ausrichtung, die wie oben beschrieben durchgeführt wurde, abgeleitet. Wie die Tabelle zeigen war eine Reihe von Sequenzen unter verschiedenen Organismen konserviert.

**[0114]** Beispielhafte Antisense-Oligomere zu *E. coli*-16S-rRNA (SEQ ID NO: 32 und SEQ ID NO: 35) wurden basierend auf der Sequenz, die in der GenBank-Zugangsnummer X80725 gefunden wird, gestaltet. Weitere beispielhafte Antisense-Oligomere zu *E. coli*-16S-rRNA und einer oder mehreren bakteriellen 16S-rRNA-Sequenz(en) sind in Tabelle 2A geliefert.

**[0115]** Beispielhafte Antisense-Oligomere zu *Salmonella thyphimurium*-16S-rRNA (SEQ ID NO: 18 und SEQ ID NO: 36) wurden basierend auf der Sequenz, die in der GenBank-Zugangsnummer U88545 gefunden wird, gestaltet. Weitere beispielhafte Antisense-Oligomere zu *S. thyphi*-16S-rRNA und einer oder mehreren anderen bakteriellen 16S-rRNA-Sequenz(en) werden in Tabelle 2A geliefert.

**[0116]** Beispielhafte Antisense-Oligomere zu *Pseudomonas aeruginosa*-16S-rRNA (SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 und SEQ ID NO: 43) wurden basierend auf der Sequenz, die in der GenBank-Zugangsnummer AF170358 gefunden wird, gestaltet.

**[0117]** Beispielhafte Antisense-Oligomere zu *Vibrio cholera*-16S-rRNA (SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 und SEQ ID NO: 47) wurden basierend auf der Sequenz, die in der GenBank-Zugangsnummer AF118021 gefunden wird, gestaltet. Ein weiteres beispielhaftes Antisense-Oligomer zu *Vibrio cholera*-16S-rRNA und anderen bakteriellen 16S-rRNA-Sequenzen (SEQ ID NO: 44) wird in Tabelle 2A geliefert.

Tabelle 2A. BAKTERIELLE 16S-rRNA-SEQUENZEN UND ANTISENSE-OLIGOMERE

Organismus	GenBank-Bezugsname	Natürliche Sequenz	Antisense-Oligomer
<i>E. coli</i> (NS-1) <i>Shigella dys.</i>	X80725 nt 446-466 X96966 nt 436-456	GAGTAAAGTTAAT ACCTTTGC	GCAAAGGTATTAA CTTTACT (SEQ ID NO:17)
<i>E. coli</i> (BS-1) <i>S. thyphi</i> <i>Shigella dys.</i>	X80725 nt 1270-1290 U88545 nt 1282-1302 X96966 nt 1263-1283	TCATAAAGTGCGT CGTAGTCC	GGACTACGACGCA CTTTATGAG (SEQ ID NO:15)
<i>E. coli</i> <i>S. thyphi</i> <i>H. influenza</i>	X80725 nt 1-21 U88545 nt 10-30 M35019 nt 10-30	AGTTTGATCATGG CTCAGATT	AATCTGAGCCATG ATCAAAC (SEQ ID NO:31)
<i>E. coli</i>	X80725 nt 173-193	ACGTCGCAAGCAC AAAGAGGG	CCCTCTTTGTGCT TGCGACGT (SEQ ID NO:32)
<i>E. coli</i> <i>S. thyphi</i> <i>Shigella dys.</i>	X80725 nt 643-663 U88545 nt 652-672 X96966 nt 653-673	TTGAGTCTCGTAG AGGGGGGT	ACCCCCCTCTACG AGACTCAA (SEQ ID NO:33)

<i>E. coli</i> <i>S. thyphi</i> <i>Shigella dys.</i>	X80725 nt 823-843 U88545 nt 832-852 X96966 nt 813-833	GGTTGTGCCCTTG AGGCGTGG	CCACGCCTCAAGG GCACAACC (SEQ ID NO:34)
<i>E. coli</i>	X80725 nt 991-1011	CGGAAGTTTTTCAG AGATGAGA	TTCATCTCTGAA AACTTCCG (SEQ ID NO:35)
<i>S. thyphi</i> (NS-2)	U88545 nt 455-475	GTTGTGGTTAATA ACCGCAGC	GCTGCGGTTATTA ACCACAAC (SEQ ID NO:18)
<i>S. thyphi.</i> (BS-2) <i>E. coli</i> <i>Shigella dys.</i>	U88545 nt 1261-1281 X80725 nt 1252-1272 X96966 nt 1242-1262	CCTCGCGAGAGCA AGCGGACC	GGTCCGCTTGCTC TCGCGAGG (SEQ ID NO:16)
<i>S. thyphi.</i>	U88545 nt 1-21	AAATTGAAGAGTT TGATCATG	CATGATCAAACCTC TTCAATTT (SEQ ID NO:36)
<i>S. thyphi.</i> <i>Shigella dys.</i>	U88545 nt 181-201 X96966 nt 162-182	ACGTCGCAAGACC AAAGAGGG	CCCTCTTTGGTCT TGCGACGT (SEQ ID NO:37)
<i>S. thyphi.</i> <i>E. coli</i> <i>Shigella dys.</i>	U88545 nt 652-672 X80725 nt 643-663 X96966 nt 633-653	TGAGTCTCGTAGA GGGGGGTA	TACCCCTCTAC GAGACTCA (SEQ ID NO:38)
<i>S. thyphi.</i> <i>E. coli</i> <i>Shigella dys.</i>	U88545 nt 832-852 X80725 nt 823-843 X96966 nt 813-833	GTTGTGCCCTTGA GGCGTGGC	GCCACGCCTCAAG GGCACAAC (SEQ ID NO:39)
<i>P. aeruginosa</i>	AF170358 nt 1-21	ATGAAGAGGGCTT GCTCTCTG	CAGAGAGCAAGC CCTCTTCAT (SEQ ID NO:40)
<i>P. aeruginosa</i>	AF170358 nt 107-127	CGTCCTACGGGAG AAAGCAGG	CCTGCTTTCTCCC GTAGGACG (SEQ ID NO:41)
<i>P. aeruginosa</i>	AF170358 nt 578-598	AGAGTATGGCAGA GGGTGGTG	CACCACCCTCTGC CATACTCT (SEQ ID NO:42)
<i>P. aeruginosa</i>	AF170358 nt 758-778	TTGGGATCCTTGA GATCTTAG	CTAAGATCTCAAG GATCCCAA (SEQ ID NO:43)
<i>Vibrio cholera</i> <i>E. coli</i> <i>H. influenza</i> <i>S. thyphi.</i> <i>Shigella dys.</i>	AF118021 nt 1-21 X80725 nt 19-39 M35019 nt 26-46 U88545 nt 18-48 X96966 nt 9-29	ATTGAACGCTGGC GGCAGGCC	GGCCTGCCGCCAG CGTTCAAT (SEQ ID NO:44)
<i>Vibrio cholera</i>	AF118021 nt 157-177	ATGTTTACGGACC AAAGAGGG	CCCTCTTTGGTCC GTAAACAT (SEQ ID NO:45)
<i>Vibrio cholera</i>	AF118021 nt 625-645	GCTAGAGTCTTGT AGAGGGGG	CCCCCTCTACAAG ACTCTAGC (SEQ ID NO:46)
<i>Vibrio cholera</i>	AF118021 nt 805-825	GAGGTTGTGACCT ARAGTCGT	ACGACTYTAGGTC ACAACCTC (SEQ ID NO:47)

## 1: Ungefähre Nucleotid-Lokalisationen

**[0118]** Beispielhafte Antisense-Oligomere zu *Neisseria gonorrhoea*-16S-rRNA (SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 und SEQ ID NO: 51) wurden basierend auf der Sequenz, die in der GenBank-Zugangsnummer X07714 gefunden wird, gestaltet. Diese sind unten in Tabelle 2B gezeigt.

**[0119]** Beispielhafte Antisense-Oligomere zu *Staphylococcus aureus*-16S-rRNA (SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 und SEQ ID NO: 55) wurden basierend auf der Sequenz, die in der GenBank-Zugangsnummer Y15856 gefunden wird, gestaltet. Ein weiteres beispielhaftes Antisense-Oligomer zu einer *Staph. aureus*-16S-rRNA und einer *Bartonella henselae*-16S-rRNA-Sequenz (SEQ ID NO: 52) wird unten in Tabelle 2B geliefert.

[0120] Beispielhafte Antisense-Oligomere zu Mycobacterium tuberculosis-16S-rRNA (SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 und SEQ ID NO: 59) wurden basierend auf der Sequenz, die in der GenBank-Zugangsnummer X52917 gefunden wird, gestaltet.

[0121] Beispielhafte Antisense-Oligomere zu Helicobacter pylori-16S-rRNA (SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 und SEQ ID NO: 63) wurden basierend auf der Sequenz, die in der GenBank-Zugangsnummer M88157 gefunden wird, gestaltet.

[0122] Beispielhafte Antisense-Oligomere zu Streptococcus pneumoniae-16S-rRNA (SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 und SEQ ID NO: 67) wurden basierend auf der Sequenz, die in der GenBank-Zugangsnummer AF003930 gefunden wird, gestaltet.

[0123] Beispielhafte Antisense-Oligomere zu Treponema palladium-16S-rRNA (SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 und SEQ ID NO: 71) wurden basierend auf der Sequenz, die in der GenBank-Zugangsnummer AJ010951 gefunden wird, gestaltet. Ein weiteres beispielhaftes Antisense-Oligomer zu Treponema palladium-16S-rRNA und anderen 16S-rRNA-Sequenzen ist (SEQ ID NO: 68), wird unten in Tabelle 2B geliefert.

Tabelle 2B. BAKTERIELLE 16s-rRNA-SEQUENZEN UND ANTISENSE-OLIGOMERE

Organismus	GenBank- Bezugnahme	Natürliche Sequenz	Antisense-Oligomer
<i>N. gonorrhoea</i>	X07714 nt 1-21	TGAACATAAGAGT TTGATCCT	AGGATCAAACCTCTTATGTTCA (SEQ ID NO:48)
<i>N. gonorrhoea</i>	X07714 nt 183-203	CGTCTTGAGAGGG AAAGCAGG	CCTGCTTTCCTCTCAAGACG (SEQ ID NO:49)
<i>N. gonorrhoea</i>	X07714 nt 654-674	CGAGTGTGTCAGA GGGAGGTG	CACCTCCCTCTGACACACTCG (SEQ ID NO:50)
<i>N. gonorrhoea</i>	X07714 nt 834-854	TTGGGCAACTTGA TTGCTTGG	CCAAGCAATCAAGTTGCCAA (SEQ ID NO:51)
<i>Staph. aureus</i> <i>Bartonella hens</i>	Y15856 nt 1-21 X89208 nt 3-23	CTGGCTCAGGATG AACGCTGG	CCAGCGTTCATCCTGAGCCAG (SEQ ID NO:52)
<i>Staph. aureus</i>	Y15856 nt 163-183	ATATTTTGAACCG CATGGTTC	GAACCATGCGGTTCAAATAT (SEQ ID NO:53)
<i>Staph. aureus</i>	Y15856 nt 640-660	CTTGAGTGCAGAA GAGGAAAG	CTTTCCTTCTGCACTCAAG (SEQ ID NO:54)
<i>Staph. aureus</i>	Y15857 nt 447-466		ATGTGCACAGTTACTTACAC av <sub>i</sub> -Bezugsnr.23
<i>Staph. aureus</i>	Y15857 nt 1272- 1291		CTGAGAACAACCTTATGGGA av <sub>i</sub> -Bezugsnr.24

<i>Staph. aureus</i>	Y15856 nt 819-839	GTGTTAGGGGGTT TCCGCCCC	GGGGCGGAAACCCCTAACAC (SEQ ID NO:55)
<i>Myc. tubercul.</i>	X52917 nt 1-21	GGCGGCGTGCTTA ACACATGC	GCATGTGTTAAGCACGCCGCC (SEQ ID NO:56)
<i>Myc. tubercul.</i>	X52917 nt 138-158	GGACCACGGGATG CATGTCTT	AAGACATGCATCCCGTGGTCC (SEQ ID NO:57)
<i>Myc. tubercul.</i>	X52917 nt 604-624	AGAGTACTGCAGG GGAGACTG	CAGTCTCCCCTGCAGTACTCT (SEQ ID NO:58)
<i>Myc. tubercul.</i>	X52917 nt 784-804	TGGGTTTCCTTCT TGGGATC	GATCCCAAGGAAGGAAACCCA (SEQ ID NO:59)
<i>H. pylori</i>	M88157 nt 1-21	TTTATGGAGAGTT TGATCCTG	CAGGATCAAACCTCTCCATAAA (SEQ ID NO:60)
<i>H. pylori</i>	M88157 nt 181-201	ACTCCTACGGGGG AAAGATTT	AAATCTTTCCCCCGTAGGAGT (SEQ ID NO:61)
<i>H. pylori</i>	M88157 nt 613-633	AGAGTGTGGGAGA GGTAGGTG	CACCTACCTCTCCCACACTCT (SEQ ID NO:62)
<i>H. pylori</i>	M88157 nt 794-814	TTGGAGGGCTTAG TCTCTCCA	TGGAGAGACTAAGCCCTCCAA (SEQ ID NO:63)
<i>Strep. pneumoniae</i>	AF003930 nt 1-21	ATTTGATCCTGGC TCAGGACG	CGTCCTGAGCCAGGATCAAAT (SEQ ID NO:64)
<i>Strep. pneumoniae</i>	AF003930 169-189	AGAGTGGATGTTG CATGACAT	ATGTCATGCAACATCCACTCT (SEQ ID NO:65)
<i>Strep. pneumoniae</i>	AF003930 646-666	TTGAGTGCAAGAG GGGAGAGT	ACTCTCCCCTCTTGCACTCAA (SEQ ID NO:66)
<i>Strep. pneumoniae</i>	AF003930 826-846	GTTAGACCCTTTC CGGGGTTT	AAACCCCGGAAAGGGTCTAAC (SEQ ID NO:67)
<i>Treponema pallad.</i> <i>S. thyphi.</i> <i>H. influenza</i>	AJ010951 nt 1-21 U88545 nt 8-28 M35019 nt 8-28	AGAGTTTGATCAT GGCTCAGA	TCTGAGCCATGATCAAACCTCT (SEQ ID NO:68)
<i>Treponema pallad.</i>	AJ010951 nt 173-193	ACTCAGTGCTTCA TAAGGGGT	ACCCCTTATGAAGCACTGAGT (SEQ ID NO:69)
<i>Treponema pallad.</i>	AJ010951 nt 651-671	TTGAATTACGGAA GGGAAACT	AGTTTCCCTTCCGTAATTCAA (SEQ ID NO:70)
<i>Treponema pallad.</i>	AJ010951 nt 831-851	GTTGGGGCAAGAG CTTCAGTG	CACTGAAGCTCTTGCCCCAAC (SEQ ID NO:71)

## 2 Ungefähre Nucleotid-Lokalisationen

**[0124]** Beispielhafte Antisense-Oligomere zu *Chlamydia trachomatis*-16S-rRNA (SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 und SEQ ID NO: 75) wurden basierend auf der Sequenz, die in der GenBank-Zugangsnummer D85722 gefunden wird, gestaltet. Diese sind unten in Tabelle 2C gezeigt.

**[0125]** Beispielhafte Antisense-Oligomere zu *Bartonella henselae*-16S-rRNA (SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 und SEQ ID NO: 79) wurden basierend auf der Sequenz, die in der GenBank-Zugangsnummer X89208 gefunden wird, gestaltet.

**[0126]** Beispielhafte Antisense-Oligomere zu *Hemophilis influenza*-16S-rRNA (SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 und SEQ ID NO: 83) wurden basierend auf der Sequenz, die in der GenBank-Zugangsnummer M35019 gefunden wird, gestaltet. Ein weiteres beispielhaftes Antisense-Oligomer zu einer *H. influenza*-16S-rRNA-Sequenz und einer *Salmonella thyphimurium*-16S-rRNA-Sequenz (SEQ ID NO: 80) wird unten in Tabelle 2C geliefert.

**[0127]** Ein beispielhaftes Antisense-Oligomer zu *Shigella dysenteriae*-16S-rRNA (SEQ ID NO: 88) wurde basierend auf der Sequenz, die in der GenBank-Zugangsnummer X96966 gefunden wird, gestaltet. Weitere beispielhafte Antisense-Oligomere zu *Shigella dys*-16S-rRNA und einer oder mehreren anderen bakteriellen 16S-rRNA-Sequenzen sind, werden in Tabelle 2C geliefert.

Tabelle 2C. BAKTERIELLE 16s-rRNA-SEQUENZEN UND ANTISENSE-OLIGOMERE

Organismus	GenBank- Bezugnahme	Natürliche Sequenz	Antisense-Oligomer
<i>Chlamydia trach.</i>	D85722 nt 1-21	CTGAGAATTTGA TCTTGGTTC	GAACCAAGATCAAATTCTCAG (SEQ ID NO:72)
<i>Chlamydia trach.</i>	D85722 nt 176-196	ATATTTGGGCATC CGAGTAAC	GTTACTCGGATGCCCAAATAT (SEQ ID NO:73)
<i>Chlamydia trach.</i>	D85722 nt 658-678	AGAGGGTAGATG GAGAAAAGG	CCTTTTCTCCATCTACCCTCT (SEQ ID NO:74)
<i>Chlamydia trach.</i>	D85722 nt 838-858	TGGATGGTCTCA ACCCCATCC	GGATGGGGTTGAGACCATCCA (SEQ ID NO:75)
<i>Bartonella hens.</i>	X89208 nt 1-21	TCCTGGCTCAGG ATGAACGCT	AGCGTTCATCCTGAGCCAGGA (SEQ ID NO:76)
<i>Bartonella hens.</i>	X89208 nt 149-169	CGTCCACTGGA GAAAGATTT	AAATCTTTCTCCAGTAGGACG (SEQ ID NO:77)
<i>Bartonella hens.</i>	X89208 nt 581-601	TGAGTATGGAAG AGGTGAGTG	CACTCACCTCTTCCATACTCA (SEQ ID NO:78)
<i>Bartonella hens.</i>	X89208 nt 761-781	TTGGGTGGTTTAC TGCTCAGT	ACTGAGCAGTAAACCACCCAA (SEQ ID NO:79)
<i>H. influenza</i> <i>S. thyphi.</i>	M35019 nt 2-21 U88545 nt 2-21	AATTGAAGAGTT TGATCATG	CATGATCAAACCTCTTCAATTN (SEQ ID NO:80)
<i>H. influenza</i>	M35019 nt 180-200	TATTATCGGAAG ATGAAAGTG	CACTTTCATCTTCCGATAATA (SEQ ID NO:81)
<i>H. influenza</i>	M35019 nt 649-669	AACTAGAGTACT TTAGGGAGG	CCTCCCTAAAGTACTCTAGTT (SEQ ID NO:82)
<i>H. influenza</i>	M35019 nt 829-849	GGGGGTGGGGT TTAACTCTG	CAGAGTTAAACCCCAACCCCC (SEQ ID NO:83)
<i>Shigella dys.</i> <i>E. coli</i> <i>S. thyphi.</i> <i>N. gonorrhoea</i> <i>H. influenza</i>	X96966 nt 1-21 X80725 nt 11-31 X96966 nt 20-40 X07714 nt 21-41 M35019 nt 20-40	TGGCTCAGATTG AACGCTGGC	GCCAGCGTTCAATCTGAGCCA (SEQ ID NO:84)
<i>Shigella dys.</i> <i>S. thyphi.</i>	X96966 nt 162-182 X96966 nt 181-201	ACGTCGCAAGAC CAAAGAGGG	CCCTCTTTGGTCTTGCGACGT (SEQ ID NO:85)
<i>Shigella dys.</i> <i>E. coli</i> <i>S. thyphi.</i>	X96966 nt 633-653 X80725 nt 644-664 X96966 nt 652-672	TGAGTCTCGTAG AGGGGGGTA	TACCCCCCTCTACGAGACTCA (SEQ ID NO:86)
<i>Shigella dys.</i> <i>E. coli</i>	X96966 nt 813-833 X80725 nt 824-844	GTTGTGCCCTTGA GGCGTGCC	GCCACGCCTCAAGGGCACAAC (SEQ ID NO:87)
<i>S. thyphi.</i>	X96966 nt 832-852		
<i>Shigella dys.</i>	X96966 nt 983-1003	GAACCTTGTAGA GATACGAGG	CCTCGTATCTCTACAAGGTTT (SEQ ID NO:88)

3 Ungefähre Nucleotid-Lokalisationen

**[0128]** Beispielhafte Gram-positive bakterielle Ziele schließen *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Streptococcus pneumoniae* ein, sind aber nicht darauf limitiert.

**[0129]** Beispielhafte Antisense-Oligomer-Sequenzen zu Gram-positiven bakteriellen 16S-rRNA-Sequenzen werden in Tabelle 3 durch die Sequenzen beispielhaft dargestellt, die als SEQ ID NO: 27 und SEQ ID NO: 28 dargelegt sind, wobei die bakteriellen 16s-rRNAs, gegen die die beispielhaften Antisense-Oligomeren gerichtet sind, in Tabelle 3 als „+“ angezeigt werden und jene, gegen die sie nicht gerichtet sind, als „-“ angezeigt werden.

Tabelle 3. GRAM-POSITIVE 16s-rRNA-SEQUENZEN UND ANTISENSE-OLIGOMERE

Organismus	SEQUENZ	AACTACGTGCCAGC AGCCGCG	TCGTGAGATGTTGG GTAAAGT
	ANTISENSE	CGCGGCTGCTGGCA CGTAGTT	ACTTAACCCAACATC TCACGA
<i>Staph aureus</i>	Y15856	+	+
<i>Myco. tubercul.</i>	X52917	+	+
<i>Strep. pneumoniae</i>	AF003930	+	+
<i>E. coli</i>	X80725	-	-
<i>S. thyphi</i>	U88545	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	AF170358	-	+
<i>Vibrio cholera</i>	AF118021	-	-
<i>N. gonorrhoea</i>	X07714	+	+
<i>H. pylori</i>	M88157	-	+
<i>Treponema pallad.</i>	AJ010951	-	-
<i>Chlamydia trach.</i>	D85722	-	-
<i>Bartonella hens</i>	X89208	-	+
<i>H. influenza</i>	M35019	-	-
<i>Shigella dys.</i>	X96966	-	-

4 Basierend auf den Nucleotiden 497–517 von GenBank Y15856, bezeichnet SEQ ID NO: 27

5 Basierend auf den Nucleotiden 1064–1084 von GenBank Y15856, bezeichnet SEQ ID NO: 28

**[0130]** Beispielhafte Gram-negative bakterielle Ziele schließen *E. coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholera*, *Neisseria gonorrhoea*, *Helicobacter pylori*, *Bartonella henselae*, *Hemophilis Influenza* und *Shigella dysenterae* ein, sind aber nicht darauf limitiert.

**[0131]** Beispielhafte Antisense-Oligomer-Sequenzen zu Gram-negativen bakteriellen 16S-rRNA-Sequenzen sind in Tabelle 4 durch die Sequenzen, die als SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 30 dargelegt sind, beispielhaft dargelegt, wobei die bakteriellen 16s-rRNAs, gegen die die beispielhaften Antisense-Oligomeren gerichtet sind, in Tabelle 4 als „+“ angezeigt werden und jene gegen, die sie nicht gerichtet sind, als „-“ angezeigt werden.

Tabelle 4. GRAM-NEGATIVE 16s-rRNA-SEQUENZEN UND ANTISENSE-OLIGOMERE

Organismus	SEQUENZ	TCGGAATTACTGGGC GTAAA	CCGCCCGTCACACCAT GGGAGT
	ANTISENSE	TTTACGCCCAGTAATT CCGA	ACTCCCATGGTGTGACG GGCGG
<i>E. coli</i>	X80725	+	+
<i>S. thyphi</i>	U88545	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	AF170358	+	+
<i>Vibrio cholera</i>	AF118021	+	+
<i>N. gonorrhoea</i>	X07714	+	+
<i>Staph aureus</i>	Y15856	-	-
<i>Myc. tubercul.</i>	X52917	-	-
<i>H. pylori</i>	M88157	-	+
<i>Strep. pneumoniae</i>	AF003930	-	-
<i>Treponema pallad.</i>	AJ010951	-	+
<i>Chlamydia trach.</i>	D85722	-	+
<i>Bartonella hens</i>	X89208	-	+
<i>H. influenza</i>	M35019	-	+
<i>Shigella dys.</i>	X96966	+	+

6 Basierend auf den Nucleotiden 546–566 von Gen Bank X80725, bezeichnet als SEQ ID NO: 29

7 Basierend auf den Nucleotiden 1389–1409 von GenBank X80725, bezeichnet als SEQ ID NO: 30

**[0132]** Beispielhafte bakterielle Ziele für Breispektrum-Antisense-Oligomere schließen *E. coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholera*, *Neisseria gonorrhoea*, *Helicobacter pylori*, *Bartonella henselae*, *Hemophilis Influenza*, *Shigella dysenterae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Treponema palladium* und *Chlamydia trachomatis* ein, sind aber nicht darauf limitiert. (Siehe Tabelle 1.)

**[0133]** Beispielhafte Breitspektrum-Antisense-Oligomere werden in den Tabellen 5A und 5B als SEQ ID NOs: 21–25 präsentiert, wobei die bakteriellen 16s-rRNAs, gegen die die beispielhaften Antisense-Oligomere gerichtet sind, in den Tabellen 5A und 5B als „+“ angezeigt werden und jene, gegen die sie nicht gerichtet sind, als „-“ angezeigt werden.

Tabelle 5A. BREITSPEKTRUM-ANTISENSE-OLIGONUCLEOTIDSEQUENZEN

Organismus	SEQUENZ	AGACTCCTACGG GAGGCAGCA	CGTGCCAGCAGC CGCGGTAAT	AACAGGATTAG ATACCCTGGT
	ANTISENSE	TGCTGCCTCCCCT AGGAGTCT	ATTACCGCGGCT GCTGGCAGC	ACCAGGGTATC TAATCCTGTT
<i>E. coli</i>	X80725	+	+	+
<i>S. thyphi</i>	U88545	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	AF170358	+	+	+
<i>Vibrio cholera</i>	AF118021	+	+	+
<i>N. gonorrhoea</i>	X07714	+	+	+
<i>Staph. aureus</i>	Y15856	+	+	+
<i>Myco. tubercul.</i>	X52917	+	+	+
<i>H. pylori</i>	M88157	+	+	+
<i>Strep. pneumoniae</i>	AF003930	+	+	+
<i>Treponema pallad.</i>	AJ010951	+	+	+

<i>Chlamydia trach.</i>	D85722	+	+	+
<i>Bartonella hens</i>	X89208	+	+	+
<i>H. influenza</i>	M35019	+	+	+
<i>Shigella dys.</i>	X96966	+	+	+

8: Basierend auf den Nucleotiden 327–347 von GenBank Nr. X80725, bezeichnet als SEQ ID NO: 21

9: Basierend auf den Nucleotiden 504–524 von GenBank Nr. X80725, bezeichnet als SEQ ID NO: 22

10: Basierend auf den Nucleotiden 781–801 von GenBank Nr. X80725, bezeichnet als SEQ ID NO: 23

Tabelle 5B. BREITSPEKTRUM-ANTISENSE-OLIGONUCLEOTIDSEQUENZEN

Organismus	SEQUENZ	GCACAAGCGGTGGA GCATGTG	ATGTTGGGTTAAGT CCCGCAA
	ANTISENSE	CACATGCTCCACCG CTTGTGC	TTGCGGGACTTAAC CCAACAT
<i>E. coli</i>	X80725	+	+
<i>S. thyphi</i>	U88545	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	AF170358	+	-
<i>Vibrio cholera</i>	AF118021	+	+
<i>N. gonorrhoea</i>	X07714	-	+
<i>Staph aureus</i>	Y15856	+	+
<i>Myco. tubercul.</i>	X52917	-	+
<i>H. pylori</i>	M88157	-	+
<i>Strep. pneumoniae</i>	AF003930	+	+
<i>Treponema pallad.</i>	AJ010951	+	-
<i>Chlamydia trach.</i>	D85722	-	-
<i>Bartonella hens</i>	X89208	+	+
<i>H. influenza</i>	M35019	+	+
<i>Shigella dys.</i>	X96966	+	+

11: Basierend auf den Nucleotiden 924–944 von GenBank Nr. X80725, bezeichnet als SEQ ID NO: 24

12: Basierend auf den Nucleotiden 1072–1092 von GenBank Nr. X80725, bezeichnet als SEQ ID NO: 25.

## VI. Inhibitorische Aktivität von Antisense-Oligomeren

## A. Wirkung von Antisense-Oligomeren gegen bakterielle 16S-rRNA auf das bakterielle Wachstum

**[0134]** Die Wirkung von PMO-Antisense-Oligomeren auf die bakterielle Kulturlebensfähigkeit wurde unter Verwendung des unten beschriebenen Protokolls getestet; siehe „Bakterielle Kulturen“ in Materialien und Verfahren. Kurz, Test-Oligonucleotide, die in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt werden, werden zu den frisch beimpften bakteriellen Kulturen zugefügt; die Kulturen werden über Nacht, z. B. 6 bis 26 Stunden, bei 37°C inkubiert, verdünnt und auf Agar-Platten plattiert; Kolonien werden 16–24 Stunden später gezählt. Nicht-selektive bakterielle Wachstumsmedien, z. B. Agar, enthaltend Nährstoffe, die für den Typ der Bakterien, die gezüchtet werden, geeignet ist, werden verwendet, wie es allgemein auf dem Fachgebiet bekannt ist.

**[0135]** Die Lebensfähigkeit der Bakterien nach der über Nacht-Kultur mit einem Test-Oligomer basiert auf der Zahl der bakteriellen Kolonien in Antisense-Oligomer-behandelten Kulturen im Verhältnis zu unbehandelten oder Nonsense-behandelten Kulturen. Eine beispielhafte Nonsense-Kontrolle ist ein Oligomer, das antisense zu c-myc ist und das die Sequenz aufweist, präsentiert als SEQ ID NO: 139.

A1. Inhibierung von *Salmonella thyphimurium* mit einem konservierten Antisense-Sequenz-Oligomer zu 16S-rRNA.

**[0136]** Zwei Stämme von *Salmonella thyphimurium* (1535 und 1538) wurden in Brühenmedien inkubiert, wie es unten in Materialien und Verfahren beschrieben ist. Ein Antisense-Oligomer zu einer 16S-rRNA-Sequenz, die unter *E. coli*, *S. thyphimurium* und *S. dysenterae* konserviert ist („BS-1“; SEQ ID NO: 15), wurde zu einer Endkonzentration von  $\mu\text{M}$  zugefügt und das Röhrchen bei 37°C für 6 bis 16 Stunden in einen Brutschrank platziert. Am Ende der Inkubation wurde die Brühe auf Platten ausgestrichen, über Nacht für 16 bis 24 Stunden inkubiert, und die Kolonien wurden gezählt. Die Daten, die in Tabelle 6 gezeigt sind, liefern einen Hinweis, dass *Salmonella thyphimurium* durch ein 16S-rRNA-Antisense-Oligomer, das auf einer 16S-rRNA-Sequenz basiert, die unter *E. coli*, *S. thyphimurium* und *S. dysenterae* konserviert ist, inhibiert wird.

Tabelle 6. Wirkung von Breitspektrum-Antisense-Oligomer auf *Salmonella thyphimurium*

Stamm (Kulturzeit)	Kontrolle (Kolonien)	1 $\mu\text{M}$ AS zu 16S-rRNA (Kolonien)	% Inhibition
1535 (6 Stunden)	217	141	35
1535 (16 Stunden)	214	52	76
1538 (6 Stunden)	824	664	19
1538 (16 Stunden)	670	133	80

A2. Wirkung von Antisense-Oligomeren gegen bakterielle 16S-rRNA auf das Wachstum von *E. coli*.

**[0137]** Die Wirkung von PMO-Antisense-Oligomeren auf die Inhibierung von *E. coli* wurde unter Verwendung eines Verfahrens, wie oben beschrieben, durch Zufügen eines Antisense-Oligomers, das insbesondere gegen 20–22 Nucleotid-Teile der *E. coli* 16S-rRNA-Sequenz, die in GenBank-Zugangsnummer X80725 gefunden wird, gerichtet ist, zu individuellen *E. coli*-Kulturen bewertet. Jedes Antisense-Oligomer wurde in einer 1  $\mu\text{M}$ -Konzentration mit *E. coli*-Bakterien für 16 Stunden inkubiert, die Kulturen wurden verdünnt und auf Agarplatten plattiert, und Kolonien wurden 16–24 Stunden später gezählt. Die Ergebnisse, die in Tabelle 7 gezeigt sind, weisen darauf hin, dass PMO-Antisense-Oligomere, die gegen *E. coli*-16S-rRNA gerichtet sind, das Wachstum von Kolonien um bis zu 60% inhibierten, wobei beobachtet wurde, dass Oligomere, die gegen verschiedene Regionen der 16S-rRNA-Sequenz gerichtet sind, wirksam waren.

Tabelle 7. E. coli 16s-rRNA-Targeting-Untersuchung

AVI-Ref. Nr.	Lokalisation	Antisense - Sequenz (5'→3')	SEQ ID NO.	Prozent-Inhibition	SA	Wiederh. (n)
9	1263-1283	GCA CTT TAT GAG GTC CGC TTG	19	59.8	3.4	8
15	1272-1293	GGA CTA CGA CGC ACT TTA TGA G	15	19.5	7.4	9
16	1252-1272	GGT CCG CTT GCT CTC GCG AGG	16	21.5	11	9
17	446-466	GCA AAG GTA TTA ACT TTA CTC	17	66	3.3	14

27	1-20	ATC TGA GCC ATG ATC AAA CT	97	55.2	9.7	5
28	301-320	TGT CTC AGT TCC AGT GTT GC	98	35	7.2	8
29	722-741	GTC TTC GTC CAG GGG GCC GC	99	52.5	4	7
30	1021-1040	CAC CTG TCT CAC GGT TCC CG	100	56	8.4	5
31	1431-1450	CGC CCT CCC GAA GTT AAG CT	101	43	13	5

[0138] Fig. 5 zeigt die Ergebnisse einer Untersuchung über die Wirkung von verschiedenen Konzentrationen des PMO, das die SEQ ID NO: 15 aufweist (Breitspektrum), das gegen eine bakterielle 16S-rRNA-Konsensus-Sequenz gerichtet ist, auf die bakterielle Koloniebildung in E. coli, dargestellt als Prozentinhibition der Koloniebildung. Wie die Figur zeigt, wurde eine etwa 70% Inhibition bei etwa 0,1 µM PMO erzielt.

### A3. Inhibition von Staphylococcus aureus und Pseudomonas aeruginosa mit Antisense-Oligomeren zu 16S-rRNA.

[0139] Die Tabellen 8 und 9 zeigen die Wirkung von Oligomeren, die gegen 16S-rRNA gerichtet sind, bei einer Konzentration von 1 µM auf das bakterielle Wachstum bei Staphylococcus aureus und Pseudomonas aeruginosa. In einem typischen Experiment wurden Antisense-Oligomere, die gegen bestimmte 22-Nucleotid-Teile der Staphylococcus aureus- und Pseudomonas aeruginosa-16-rRNA-Sequenzen gerichtet sind, die bei den GenBank-Zugangsnummer Y15857 beziehungsweise 276651 gefunden werden, mit den entsprechenden Bakterien in einer Konzentration von 1 µM für 16 Stunden inkubiert. Das Wachstum von S. aureus wurde um bis zu 25% inhibiert, und das Wachstum von P. aeruginosa wurde um bis zu etwa 53% inhibiert.

Tabelle 8. Staphylococcus aureus-16s-rRNA-Targeting-Untersuchung

AVI Bez. Nr.	Lokalisation	Antisense -Sequenz (5'→3')	SEQ ID NO	Prozent Inhibition	SA	n =
23	447-466	ATG TGC ACA GTT ACT TAC AC	93	2.5	8.6	2
24	1272-1291	CTG AGA ACA ACT TTA TGG GA	94	25.3	11	2

Tabelle 9. Pseudomonas aeruginosa 16s-rRNA Targeting-Untersuchung

AVI Bez.-Nr.	Lokalisation	Antisense-Sequenz (5'→3')	SEQ ID NO:	Prozent- Inhibition	SA	n =
25	447-466	TTA TTC TGT TGG TAA CGT CA	95	37.3	9.8	3
26	1272-1291	CG AGT TGC AGA CTG CGA TC	96	52.7	7.1	3

**[0140]** Die Inhibition von Listeria wurde auch durch ein entsprechendes Anti-16S-PMO gezeigt. Eine sehr niedrige Dosis (etwa 30 nM) des PMO ergab etwa 40% Inhibition.

A4. Wirkung von Antisense-Oligomeren gegen bakterielle rRNA auf das Wachstum von Vancomycin-resistentem Enterococcus faecium (VRE)

(a) Bakterielle 16S-rRNA-Ziele

**[0141]** Die Wirkung von PMO-Antisense-Oligomeren auf das Wachstum von VRE wurde unter Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens durch Zugabe von Antisense-PMO's, die gegen zahlreiche 16S-rRNA-Sequenzen gerichtet sind, zu Kulturen von VRE und Inkubieren bei einer Konzentration von 1 µM für 16 Stunden bewertet. Die Ergebnisse, die in Tabelle 10 und in [Fig. 6](#) gezeigt sind, weisen darauf hin, dass die Inhibition von etwa 48% bis etwa 70%, was ein Mittel von etwa 60% ergibt, reicht, wobei keine signifikanten Unterschiede in der Wirksamkeit unter den getesteten Oligomeren gesehen wird. (Das Nucleotidsymbol „M“ in den Sequenzen repräsentiert Methylcytidin.)

**[0142]** [Fig. 6](#) illustriert die Wirkung eines Breitspektrum-PMO auf die VRE-Koloniebildung. Das Oligomer, bezeichnet SEQ ID NO: 114, wird als Breitspektrum erachtet, gerichtet gegen eine Region, die in allen der in Tabelle 5A oben aufgelisteten Bakterien konserviert ist. Dieses Oligomer ist ungefähr gegen dieselbe Region gerichtet wie jene, gegen die SEQ ID NO: 23 gerichtet ist, die in Tabelle 5A gezeigt ist. Wie aus den Daten in Tabelle 10 gesehen werden kann, war dieses Oligomer in der Wirksamkeit ähnlich zu einem „Engspektrum“-Oligomer, das spezifisch gegen Enterococcus ist, SEQ ID NO: 115.

**[0143]** Es wurden auch einige Oligomere eingeschlossen, die spezifisch gegen 16S-rRNA von anderen Organismen (E. coli, S. aureus und P. aeruginosa) sind. Diese Oligomere hatten keine inhibitorische Wirkung auf VRE.

Tabelle 10. Targeting-Untersuchung in *Enterococcus faecium*.

PMO - Quelle	GenBank-Zugangsnr.	Lokalisation	Antisense -Sequenz (5'→3')	SEQ ID	Prozent-Inhibition	SA	n =
VRE	Y18294	447-466	GAT GAA CAG TTA CTC TCA TC	91	61.7	2.7	3
VRE	Y18294	1272-1291	ACT GAG AGA AGC TTT AAG AG	92	59.7	5.1	6
VRE	Y18294	1-20	GGC ACG CCG CCA GCG TTC G	102	56.7	7.8	3
VRE	Y18294	300-319	TGT CTC AGT CCC AAT GTG GC	103	53.7	1.0	3
VRE	Y18294	721-740	GTT ACA GAC CAG AGA GCC GC	104	69.7	3.0	3
VRE	Y18294	1022-1041	CAC CTG TCA CTT TGC CCC CG	105	47.9	10.1	3
VRE	Y18294	1438-1456	GGC GGC TGG CTC CAA AAG G	106	58.5	3.2	3
VRE	Y18294	776-795	GAC TAC CAG GGT ATC TAA TC	114	62.2	5.5	3
VRE	Y18294	194-213	CAG CGA CAC CCG AAA GCC CC	115	70.1	3.3	3
<i>S. aureus</i>	Siehe Tabelle 8		CTG AGA ACA ACT TTA TGG GA	94	24	8.8	3
<i>P.aeruginosa</i>	Siehe Tabelle 9		TGC AGT TGC AGA CTG CGA TC	96	26	11.6	3
<i>E. coli</i>	Siehe Tabelle 7		GCA AAG GTA TTA ACT TTA CTC	17	17	22.4	3
<i>E. coli</i>	Siehe Tabelle 7		GCA CTT TAT GAG GTC CGC TTG	19	9	10	3
VRE	Y18294	0077-95	CAC CCG TTC GCC ACT CCT C	107	45.1	6.1	3
VRE	Y18294	0895-914	TCA ATT CCT TTG AGT TTC AA	108	31.8	15.3	3
VRE	Y18294	1263-1291	GCA ATC CGC ACT GAG AGA AGC TTT AAG AG	109	39.1	11.4	6

VRE	Y18294	1268-1291	C CGC ACT GAG AGA AGC TTT AAG AG	110	50.1	5.5	6
VRE	Y18294	1275-1291	GAG AGA AGC TTT AAG AG	111	61.5	3.3	6
VRE	Y18294	1277-1291	G AGA AGC TTT AAG AG	112	46.3	5	6
VRE	Y18294	1282-1291	A AGC TTT AAG AG	113	39.5	8.2	6
VRE	Y18294	1274-1291	T GAG AGA AGC TTT AAG AG	121	57.2	4.8	3
VRE	Y18294	1273-1291	CT GAG AGA AGC TTT AAG AG	122	54.4	2.7	3
VRE	Y18294	196-213	GCG ACA CCC GAA AGC GCC	123	59.0	5.3	6
VRE	Y18294	723-740	TAC AGA CCA GAG AGC CGC	124	63.3	4.9	9
VRE	Y18294	197-213	CGA CAC CCG AAA GCG CC	125	63.6	3.7	9
VRE	Y18294	195-213	A GCG ACA CCC GAA AGC GCC	126	60.6	4.8	12
VRE	Y18294	196-213	CG ACA CCC GAA AGC GCC A	127	58.9	5.6	9
VRE	Y18294	197-213	MG AMA MMM GAA AGM GMM	128	60.3	4.5	9
VRE	Y18294	723-740	TAM AGA MMA GAG AGM MGM	129	56.9	3.9	9
VRE	Y18294	1162-1177	MMM MAM MTT MTT MMG G	130	56.1	3.7	9
VRE	Y18294	1345-1363	CAC CGC GGC GTG CTG ATC C	131	64.0	3.9	6
VRE	Y18294	1162-1177	CCC CAC CTT CCT CCG G	132	70.2	1.6	3
VRE	Y18294	916-933	CCG CTT GTG CGG GCC CCC	133	66.8	4.3	3
VRE	Y18294	1345-1362	CAC CGC GGC GTG CTG ATC	134	71.4	11.3	3
VRE	Y18294	1345-1361	CAC CGC GGC GTG CTG AT	135	57.3	3.8	3
VRE	Y18294	1346-1364	ACC GCG GCG TGC TGA TCC	136	75.0	4.4	3
VRE	Y18294	1344-1360	CCG CGG CGT GCT GAT CC	137	66.3	3.5	3
VRE	Y18294	1346-1363	ACC GCG GCG TGC TGA TC	138	63.8	2.2	3

M repräsentiert Methylcytidin.

7

[0144] Eine Dosis-Antwort-Untersuchung wurde auch unter Verwendung von unterschiedlichen Konzentrationen des Oligomers, das die SEQ ID NO: 92 hat, durchgeführt. Etwa 70% Inhibition wurde bei 1–10 µM, etwa 50% bei 0,1 µM, etwa 20% bei 0,01 µM und etwa 12% bei 1 nM erreicht.

## (b) Bakterielle 23S-rRNA-Ziele

**[0145]** In einem verwandten Experiment wurde auch unter Verwendung von Vancomycin-resistentem *Enterococcus faecium* (VRE) als die Zielbakterien die Wirkung von PMO-Antisense-Oligomeren, gegen die 23S-rRNA-Sequenzen gerichtet sind, auf das bakterielle Wachstum unter Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens bewertet. In individuellen Tests wurden die Antisense-PMOs, die gegen VRE-23S-rRNA-Sequenzen gerichtet sind, zu Kulturen von VRE zugefügt und bei einer Konzentration von 1 µM für 16 Stunden inkubiert. Die Daten in Tabelle 11 unten, graphisch in [Fig. 7](#) dargestellt, zeigen, dass Antisense-Targeting von 23S-rRNA in VRE erfolgreich im Inhibieren des bakteriellen Wachstums war. Die Lokalisationen nehmen auf GenBank-Zugangsnr. X79341 Bezug.

Tabelle 11. VRE-23S-rRNA-Targeting-Untersuchung

Bezugs-Nr.	Lokalisation	Antisense -Sequenz (5'→3')	SEQ ID NO:	Prozent-Inhibition	SA (N=3)
46	20-39	GTG CCA AGG CAT CCA CCG TG	116	61.9	4.6
47	679-698	CAT ACT CAA ACG CCC TAT TC	117	46.8	6.6
48	1462-1480	CCT TAG CCT CCT GCG TCC C	118	47.6	7.5
49	2060-2079	GGG GTC TTT CCG TCC TGT CG	119	67.0	5.7
50	2881-2900	CGA TCG ATT AGT ATC AGT CC	120	63.0	10.5

## B. Wirkung der Länge des Antisense-Oligomers auf die Inhibition von VRE

**[0146]** Die Vorgehensweise, die verwendet wurde, um die in Tabelle 10 oben gezeigten Daten zu erhalten, wurde unter Verwendung von Versionen mit verschiedenen Längen (SEQ ID NOs: 109–113) des Anti-16S-rRNA-Oligomers, das die SEQ ID NO: 92 hat, im Bereich von einem 12-Mer (SEQ ID NO: 113) bis zu einem 29-Mer (SEQ ID NO: 109) wiederholt. Die Ergebnisse sind unten in der Tabelle 12 angegeben.

**[0147]** Wie in Tabelle 12 und [Fig. 8](#) gezeigt, war die optimale Länge in dieser Untersuchung im 17- bis 20-mer-Bereich. Weitere Untersuchungen bestätigten, dass Oligomere mit einer Länge von 17 bis 20 Nucleotid-Untereinheiten und mehr, bevorzugt 17–18 Untereinheiten, im Allgemeinen bevorzugt sind. Die Ergebnisse legen nahe, dass kürzere Oligomere wie 12-Mere eine nicht ausreichende Bindungsaffinität haben können und dass längere Oligomere wie das 29-Mer weniger leicht in die Zellen transportiert werden.

Tabelle 12. Antisense-Targeting von 16S-rRNA in VRE

Bezugs-Nr.	Länge	Antisense -Sequenz (5'→3')	SEQ ID NO:	Prozent Inhibition	SA	n =
39	29mer	GCA ATC CGC ACT GAG AGA AGC TTT AAG AG	109	29.1	11.4	6
40	24mer	C CGC ACT GAG AGA AGC TTT AAG AG	110	51.1	5.5	6
22	20mer	ACT GAG AGA AGC TTT AAG AG	92	59.7	5.2	6
41	17mer	GAG AGA AGC TTT AAG AG	111	61.5	3.3	6
42	15mer	G AGA AGC TTT AAG AG	112	46.3	5.0	6
43	12mer	A AGC TTT AAG AG	113	39.5	8.2	6

## C. Antisense-PMO-Resistenzuntersuchung in VRE

**[0148]** Das 20-mer Anti-16S-rRNA-Antisense-Oligomer, auf das oben Bezug genommen wird (SEQ ID NO: 92), wurde in einer Resistenzuntersuchung mit VRE verwendet. Nach jedem Tag der Inkubation (Konzentr. 1 µM) wurden drei Kolonien gepickt und wieder mit dem Oligomer behandelt, um auf eine Resistenz zu testen. Wie unten in Tabelle 13 und in [Fig. 9](#) gezeigt, stieg am Tag vier die Lebensfähigkeit etwas, sank dann aber bei Tag fünf und sechs wieder ab. Tests, die zwölf Tage ausgeführt wurden (Daten nicht gezeigt), zeigten keinen Hinweis, dass sich eine Resistenz gegen das Oligomer entwickelt hatte.

Tabelle 13. Resistenzuntersuchung mit Anti-16S-rRNA (SEQ ID NO: 92) in VRE

Tag	ProzentInhibition	SA (n = 3)
1	41.8	5.2
2	49.6	2.7
3	51.8	12.3
4	19.2	11.9
5	34.1	10.9
6	47.2	12.0

#### D. Kombinationstherapie mit antibiotischen Arzneistoffen

**[0149]** Enterococcus faecium wurde mit Vancomycin alleine und in Kombination mit 1,0 µM Antisense-PMO, das gegen VRE-16S-rRNA gerichtet war (SEQ ID NO: 92), behandelt. Die Inhibition wurde durch die Zugabe des PMO, wie in [Fig. 10A](#) gezeigt, stark erhöht, und die Organismen wurden bei 3 µM Vancomycin und 1 µM PMO vollständig eliminiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung eines Antisense-PMO, das gegen VRE-16S-rRNA gerichtet ist, zusammen mit Vancomycin in einer verstärkten antibakteriellen Wirkung im Vergleich zu jener von Vancomycin alleine resultiert.

**[0150]** Eine ähnliche Untersuchung wurde mit Vancomycin-resistentem Enterococcus faecium (VRE) durchgeführt, der mit Ampicillin alleine und in Kombination mit 1,0 µM desselben Antisense-PMO (siehe [Fig. 10B](#)) behandelt wurde. Wieder wurde eine im Wesentlichen vollständige Inhibition durch die Kombination bei 3 µM Ampicillin erreicht. Ähnlich zu den Ergebnissen, die für Vancomycin erreicht wurden, resultierte die Kombination eines Antisense-PMO, das gegen VRE-16S-rRNA gerichtet ist, und Ampicillin in einer verstärkten antibakteriellen Wirkung.

#### VII. In vivo-Verabreichung von Antisense-Oligomeren

**[0151]** In einem anderen Aspekt wird die Erfindung auf das Verlangsamen oder Limitieren einer bakteriellen Infektion in vivo in einem Säuger und/oder Senken oder Eliminieren von nachweisbaren Symptomen, die typischerweise mit einer Infektion durch jenes bestimmte Bakterium assoziiert sind, gerichtet. Im Allgemeinen wird eine therapeutisch wirksame Menge eines Antisense-Oligonucleotid-enthaltenden Arzneimittels an ein Säuger-Subjekt in einer Weise verabreicht, die wirksam ist, um die Aktivität einer 16S-rRNA zu inhibieren.

**[0152]** Die Antisense-Oligonucleotide der Erfindung und die Arzneimittel, die diese enthalten, sind für das Inhibieren einer bakteriellen Infektion in vivo in einem Säuger und für das Inhibieren oder Stoppen des Wachstums von Bakterien im Wirt nützlich. In anderen Worten, die Bakterien können mit einer geringen oder ohne schädliche(n) Wirkung auf das normale Wachstum oder die Entwicklung des Wirts in der Zahl gesenkt oder eliminiert werden.

**[0153]** In manchen Fällen wird das Antisense-Oligomer das Wachstum von Bakterien im Allgemeinen inhibieren. In anderen Fällen wird das Antisense-Oligomer spezifisch für einen oder mehrere bestimmte(n) Typ(en) von Bakterien sein, z. B. eine(n) bestimmte(n) Gattung, Spezies oder Stamm.

**[0154]** Es wird verstanden werden, dass die in vivo-Wirksamkeit eines solchen Antisense-Oligomers in einem Subjekt unter Verwendung der Verfahren der Erfindung von zahlreichen Faktoren abhängt, einschließlich (1) der Zielsequenz; (2) der Dauer, Dosis und Frequenz der Antisense-Verabreichung; und (3) des allgemeinen Zustands des Subjekts, ist aber nicht limitiert darauf.

**[0155]** Die Wirksamkeit eines in vivo-verabreichten Antisense-Oligomers der Erfindung auf die Inhibition oder Eliminierung des Wachstums von einem oder mehreren Typ(en) von Bakterien kann durch in vitro-Kultur oder mikroskopische Untersuchung einer biologischen Probe (Gewebe, Blut usw.), die von einem Subjekt vor, während und nach der Verabreichung des Antisense-Oligomers genommen wird, bestimmt werden. (Siehe zum Beispiel Pari, G. S. et al., Antimicrob. Agents and Chemotherapy 39(5): 1157–1161; 1995; Anderson, KP et al., Antimicrob. Agents and Chemotherapy 40(9): 2004–2011, 1996.)

## A. Behandlung von Subjekten

**[0156]** Eine wirksame Abgabe des Antisense-Oligomers an die Ziel-RNA ist ein wichtiger Aspekt der Behandlungen, wie sie von der Erfindung umfasst werden. Gemäß der Erfindung schließen solche Wege der Antisense-Oligomer-Abgabe verschiedene systemische Wege, einschließlich oraler und parenteraler Wege, z. B. intravenöse, subcutane, intraperitoneale und intramuskuläre sowie Inhalation-, transdermale und topische Abgabe ein, sind aber nicht darauf limitiert. Der geeignete Weg kann durch einen Fachmann als geeignet für den Zustand des Subjekts in Behandlung bestimmt werden.

**[0157]** Zum Beispiel ist ein geeigneter Weg für die Abgabe eines Antisense-Oligomers in der Behandlung einer bakteriellen Infektion der Haut eine topische Abgabe, während die Abgabe eines Antisense-Oligomers in der Behandlung einer bakteriellen respiratorischen Infektion durch Inhalation erfolgt.

**[0158]** Zusätzliche beispielhafte Ausführungsformen schließen orale Abgabe eines Antisense-Oligomers, das gegen eine bakterielle 16S- oder 23S-rRNA gerichtet ist, für die Behandlung einer Harntraktsinfektion oder Sepsis und IV-Abgabe für die Behandlung einer Sepsis ein.

**[0159]** Es wird anerkannt, dass die Verfahren, die wirksam sind, um das Oligomer an die Stelle der bakteriellen Infektion abzugeben oder um das Oligonucleotid in die Blutbahn einzubringen, erwogen werden.

**[0160]** Die transdermale Abgabe von Antisense-Oligomeren kann durch die Verwendung eines pharmazeutisch verträglichen Trägers, der für eine topische Verabreichung angepasst wurde, erreicht werden. Ein Beispiel der Morpholin-Oligomer-Abgabe ist in der PCT-Patentanmeldung WO97/40854 beschrieben.

**[0161]** In einem Aspekt der Erfindung wird ein Antisense-Oligomer, das gegen bakterielle 16S- oder 23S-rRNA gerichtet ist, durch einen Katheter, Mikrobälchen, eine Herzklappe, die mit dem Oligomer beschichtet oder imprägniert ist, einen Hickman-Katheter oder einen beschichteten Stent abgeben.

**[0162]** In der vorliegenden Erfindung ist das Oligomer ein Morpholin-Oligomer, das in einem pharmazeutisch verträglichen Träger enthalten ist, und die Abgabe erfolgt oral. In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Morpholin-Antisense-Oligonucleotid in regelmäßigen Intervallen für einen kurzen Zeitraum, z. B. täglich für zwei Wochen oder weniger verabreicht. In manchen Fällen wird jedoch das Antisense-Oligomer intermittierend über einen längeren Zeitraum verabreicht.

**[0163]** Typischerweise werden (wird) eine oder mehrere Dosen (Dosis) des Antisense-Oligomers im Allgemeinen in regelmäßigen Intervallen für einen Zeitraum von etwa einer bei zwei Woche(n) verabreicht. Bevorzugte Dosen für die orale Verabreichung sind von etwa 1 mg Oligomer/Patient bis etwa 25 mg Oligomer/Patient (basierend auf einem Gewicht von 70 kg). In manchen Fällen können Dosen von mehr als 25 mg Oligomer/Patient nötig sein. Für die IV-Verabreichung sind die bevorzugten Dosen von etwa 0,5 mg Oligomer/Patient bis etwa 10 mg Oligomer/Patient (basierend auf einem Erwachsenen-Gewicht von 70 kg).

**[0164]** Die Antisense-Verbindung wird im Allgemeinen in einer Menge und Weise verabreicht, die wirksam ist, um in einer Gipfel-Blutkonzentration von mindestens 200–400 nM Antisense-Oligomer zu resultieren.

**[0165]** Im Allgemeinen umfasst die Behandlung das Verabreichen einer Menge eines Antisense-Agens, die ausreichend ist, um die biologische Aktivität einer bakteriellen 16S- oder 23S-rRNA-Zielsequenz von Interesse zu inhibieren, in einem geeigneten pharmazeutischen Träger an ein Subjekt.

**[0166]** Es folgt, dass eine Morpholin-Antisense-Oligonucleotidzusammensetzung in jedem günstigen Vehikel verabreicht werden kann, das physiologisch verträglich ist. Solch eine Oligonucleotidzusammensetzung kann jeden einer Vielfalt von pharmazeutisch verträglichen Standardträgern, der durch Fachleute angewendet wird, einschließen. Beispiele von solchen pharmazeutischen Trägern schließen Kochsalzlösung, phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Wasser, wässriges Ethanol, Emulsionen wie Öl/Wasser-Emulsionen, Triglycerid-Emulsionen, Benetzungsmittel, Tabletten und Kapseln ein, sind aber nicht darauf limitiert. Es wird verstanden werden, dass die Wahl eines geeigneten physiologisch verträglichen Trägers abhängig von der gewählten Art der Verabreichung variieren wird.

**[0167]** In manchen Fällen können Liposomen angewendet werden, um die Aufnahme des Antisense-Oligonucleotids in die Zellen zu ermöglichen. (Siehe z. B. Williams, S. A., *Leukemia* 10(12): 1980–1989, 1996; Lapalainen et al., *Antiviral Res.* 23: 119, 1994; Uhlmann et al., *ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: A NEW THE-*

RAPEUTIC PRINCIPLES, Chemical Reviews, Band 90, Nr. 4, Seiten 544–584, 1990; Gregoriadis, G., Kapitel 14, Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine, S. 287–341, Academic Press, 1979). Hydrogele können auch als Vehikel für die Antisense-Oligomer-Verabreichung verwendet werden, zum Beispiel wie in WO 93/01286 beschrieben. Alternativ können die Oligonucleotide in Mikrosphären oder Mikropartikeln verabreicht werden. (Siehe z. B. Wu GY und Wu CH, J. Biol. Chem. 262: 4429–4432, 1987.)

**[0168]** Anhaltende Freisetzung-Zusammensetzungen werden auch im Rahmen dieser Anmeldung erwogen. Diese können semi-permeable polymerische Matrices in der Form von geformten Artikeln wie Filmen oder Mikrokapseln einschließen.

**[0169]** In einem Aspekt der Behandlung ist das Subjekt ein menschliches Subjekt, typischerweise ein Subjekt, bei dem diagnostiziert wurde, dass es eine lokalisierte oder systemische bakterielle Infektion aufweist.

**[0170]** In einem anderen Aspekt kann der Zustand des Patienten eine prophylaktische Verabreichung eines Antisense-Oligomers der Erfindung vorschreiben, d. h. eines Patienten, der (1) abwehrgeschwächt ist; (2) ein Verbrennungsoffer ist; (3) einen Dauerkatheter hat; (4) dabei ist, sich einer Operation zu unterziehen oder der sich vor kurzem einer solchen unterzogen hat, usw.

**[0171]** In einer anderen Anwendung der Behandlung ist das Subjekt ein Nutztier, z. B. ein Huhn, eine Pute, ein Schwein, eine Kuh oder Ziege usw., und die Behandlung ist entweder prophylaktisch oder therapeutisch.

**[0172]** Zusätzlich sind die Verwendungen der Erfindung auf die Behandlung von jedem Zustand, in dem das Inhibieren oder Eliminieren des Wachstums von Bakterien wirksam sein würde, um in einem verbesserten therapeutischen Ergebnis für das Subjekt in Behandlung zu resultieren, anwendbar.

**[0173]** Es wird verstanden werden, dass ein wirksamer in vivo-Behandlungsplan unter Verwendung der Antisense-Oligonucleotide der Erfindung gemäß der Häufigkeit und des Wegs der Verabreichung sowie des Zustands des Subjekts in Behandlung variieren wird (d. h. prophylaktische Verabreichung gegenüber Verabreichung in Antwort auf eine lokalisierte oder systemische Infektion). Dementsprechend wird solch eine in vivo-Therapie im Allgemeinen ein Überwachen durch Tests, die für den bestimmten Typ der bakteriellen Infektion in Behandlung geeignet sind, und eine entsprechende Anpassung in der Dosis oder des Behandlungsplan erfordern, um ein optimales therapeutisches Ergebnis zu erreichen.

## B. Überwachen der Behandlung

**[0174]** Die Wirksamkeit eines vorgegebenen therapeutischen Behandlungsplan, der die hierin beschriebenen Behandlungen involviert, kann z. B. durch allgemeine Indikatoren einer Infektion wie großes Blutbild (CBC), Nucleinsäure-Nachweisverfahren, immundiagnostische Tests oder Bakterienkulturen überwacht werden.

**[0175]** Das Identifizieren und Überwachen von bakteriellen Infektionen involviert im Allgemeinen eines oder mehrere von (1) Nucleinsäure-Nachweisverfahren; (2) serologischen Nachweisverfahren, d. h. konventionellen Immuntests; (3) Kulturverfahren; und (4) biochemischen Verfahren. Solche Verfahren können qualitativ oder quantitativ sein.

**[0176]** DNA-Sonden können basierend auf öffentlich verfügbaren bakteriellen Nucleinsäuresequenzen gestaltet und verwendet werden, um Zielgene oder Metaboliten (d. h. Toxine) nachzuweisen, die auf eine bakterielle Infektion, die für einen bestimmten bakteriellen Typ, z. B. eine bestimmte Spezies oder einen Stamm spezifisch oder für mehr als eine Spezies oder einen Typ von Bakterien (d. h. Grampositive oder Gram-negative Bakterien) gemeinsam sein kann, hinweisend sind. Zusätzlich können auch Nucleinsäure-Amplifizierungstests (z. B. PCR) in solchen Nachweisverfahren verwendet werden.

**[0177]** Eine serologische Identifizierung kann unter Verwendung einer bakteriellen Probe oder Kultur, die von einer biologischen Probe, z. B. Kot, Urin, cerebrospinaler Flüssigkeit, Blut usw. isoliert wurde, erreicht werden. Ein Immuntest für den Nachweis von Bakterien wird im Allgemeinen durch Verfahren ausgeführt, die routinemäßig durch Fachleute angewendet werden, z. B. ELISA oder Western-Blot.

**[0178]** Im Allgemeinen werden Vorgehensweisen und/oder Reagenzien für einen Immuntest für bakterielle Infektionen routinemäßig durch Fachleute angewendet. Zusätzlich sind oft monoclonale Antikörper, die spezifisch für bestimmte bakterielle Stämme oder Spezies sind, kommerziell erhältlich.

**[0179]** Kulturverfahren können verwendet werden, um bestimmte Typen von Bakterien durch Anwenden von Techniken, einschließlich aerober gegenüber anaerober Kultur und des Wachstums und der Morphologie unter verschiedenen Kulturbedingungen, aber nicht darauf limitiert, zu isolieren und zu identifizieren.

**[0180]** Beispielhafte biochemische Tests schließen Gram-Färbung (Gram, 1884; Gram-positive bakterielle Stämme färben sich dunkelblau und Gram-negative färben sich rot), enzymatische Analysen (d. h. Oxidase-, Katalase-positiv für *Pseudomonas aeruginosa*) und Phagen-Typisierung ein.

**[0181]** Es wird verstanden werden, dass das genaue Wesen von solchen diagnostischen und quantitativen Tests sowie anderen physiologischen Faktoren, die hinweisend auf eine bakterielle Infektion sind, abhängig vom bakteriellen Ziel, vom behandelten Zustand und, ob die Behandlung prophylaktisch oder therapeutisch ist, variieren wird.

**[0182]** In Fällen, in denen bei dem Subjekt diagnostiziert worden ist, dass es einen bestimmten Typ von bakterieller Infektion hat, wird der Status der bakteriellen Infektion auch unter Verwendung von diagnostischen Techniken, die typischerweise durch Fachleute verwendet werden, um den bestimmten Typ der bakteriellen Infektion in Behandlung zu überwachen, überwacht werden.

**[0183]** Der Antisense-Oligomer-Behandlungsplan kann basierend auf den Ergebnissen der Immuntestes, anderer biochemischer Tests und der physiologischen Untersuchung des Subjekts in Behandlung angepasst werden (Dosis, Häufigkeit, Weg usw.), wie angezeigt.

**[0184]** Während die Erfindung mit Bezugnahme auf spezifische Verfahren und Ausführungsformen beschrieben worden ist, wird es geschätzt werden, dass verschiedene Modifikationen gemacht werden können, ohne von der Erfindung abzuweichen.

#### MATERIALIEN UND VERFAHREN

**[0185]** Rekombinante DNA-Standardtechniken wurden in allen Konstruktionen angewendet, wie in Ausubel, FM, et al., in *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley and Sons, Inc., Media, PA, 1992 und Sambrook J, et al., in *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Bd. 2, 1989 beschrieben.

**[0186]** Plasmid. Das Plasmid, das für Untersuchungen zugunsten der vorliegenden Erfindung verwendet wurde, wurde unter Verwendung des pCi-Neo-Säuger-Expressionsvektors (Promega) durch Inserieren von 36 Basen der c-myc-Zielregion zusammen mit der codierenden Region für Leuchtkäfer-Luciferase in den Vektor im Polylinker stromabwärts vom T7-Promotor konstruiert. Das A des ATG von Codon Nr. 1 von Luciferase wurde durch in vitro-Mutagenese entfernt, so dass das ATG, das in der c-myc-Sequenz vorhanden ist, im Rahmen mit dem Reporter belassen wird. Das Plasmid pCiNeo(myc)luc $\delta$ A enthielt auch das b-Lactamase-Gen, das die antibiotische Resistenz codiert, und wurde in *Escherichia coli* DH5 transformiert.

**[0187]** Bakterienkulturen. Beim Bewerten der Wirksamkeit von Antisense-Oligonucleotiden der Erfindung wurden ungefähr 3 ml bakterielle Kulturen von einer 45 ml-Ausgangskultur in Luria-Bertani(LB)-Brühe, enthaltend 4,5 mg Ampicillin und eine einzige bakterielle Kolonie, die von frisch ausgestrichenen LB-Agarplatten, enthaltend 100  $\mu$ g/ml Ampicillin, genommen wurde, in Plastik-Schnappdeckel-Röhrchen aliquotiert. Das in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnte Test-Oligomer wurde zu den Kulturen zugefügt, bei 37°C für eine bestimmte Zeit, z. B. 16 oder 26 Stunden, unter Schütteln bei 210 UpM inkubiert, dann für 15 Minuten auf Eis platziert.

**[0188]** Kultur-Färbungsmikroskopie und Kolonie-Scanning. Bakterielle Plattenzählungen erfordern, dass ein messbares Volumen an Material zum Agar entweder durch die Gussplatten- oder Streichplatten-Technik zugefügt wird. Wenn die ursprüngliche Probe eine große Zahl von Bakterien aufweist, werden Verdünnungen hergestellt und plattiert. Die Platten werden inkubiert, und die Zahl der Kolonie-bildenden Einheiten (kbE) reflektiert die lebensfähigen Organismen in der Probe. Die Kolonien können händisch unter Verwendung eines Mikroskops gezählt werden, es wird jedoch bevorzugt, dass ein automatisches Kolonie-Zählgerät angewendet wird (z. B. wie von Bioscience International, Rockville, MD, angeboten). Bakterielle Kulturen werden gemäß Gram-Färbung-Standardprotokollen gefärbt. Die gefärbten Bakterien werden unter Verwendung eines Nikon Optiphot-2-Aufrecht-Mikroskops betrachtet, wobei die Abbildungen unter Verwendung der Kombination einer 100X-Ölimmersionslinse und der 10X-Vergößerung der Kamera 1000X vergrößert werden. Die Kamera, die verwendet wurde, um die Bilder einzufangen, ist eine Nikon N8008S. Die Bilder werden unter Verwendung der

Hellfeld-Mikroskopie mit einer 4 Sekunden-Belichtung bei einer Einstellung der Lichtausgabe von 5 aufgenommen. Ein bevorzugter Film war Kodak Gold 400 ASA. Nach dem Entwickeln werden die Bilder unter Verwendung eines Mikrotek Scan Maker 4 gescannt, dann unter Verwendung von Adobe PhotoShop geschnitten.

Sequenzprotokoll-Tabelle

Beschreibung	SEQ ID NO.	
<i>E. coli</i> GenBank Zugangsnr.: X80725	1	
<i>Salmonella thyphimurium</i> GenBank Zugangsnr.: U88545	2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GenBank Zugangsnr.: AF170358	3	
<i>Vibrio cholera</i> GenBank Zugangsnr.: AF118021	4	
<i>Staphylococcus aureus</i> GenBank Zugangsnr.: Y15856	6	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> GenBank Zugangsnr.: X52917	7	
<i>Helicobacter pylori</i> GenBank Zugangsnr.: M88157	8	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> GenBank Zugangsnr.: AF003930	9	
<i>Treponema palladium</i> GenBank Zugangsnr.: AJ010951	10	
<i>Chlamydia trachomatis</i> GenBank Zugangsnr.: D85722	11	
<i>Bartonella henselae</i> GenBank Zugangsnr.: X89208	12	
<i>Hemophilis Influenza</i> GenBank Zugangsnr.: M35019	13	
<i>Shigella dysenterae</i> GenBank Zugangsnr.: X96966	14	
0-1-23-15 (BS-1;Tabelle 2A) 5'- GGA CTA CGA CGC ACT TTA TGA G -3' (22-mer)	15	
0-1-23-16 (BS-2;Tabelle2A) 5'- GGT CCG CTT GCT CTC GCG AGG -3' (21-mer)	16	
0-1-23-17 (NS-1;Tabelle2A) 5'-GCA AAG GTA TTA ACT TTA CTC-3' (21-mer)	17	
0-1-23-18 (NS-2;Tabelle2A) 5'- GCT GCG GTT ATT AAC CAC AAC -3' (21-mer)	18	
0-1-23-9 ( <i>E. coli</i> 16S) 5'-GCA CTT TAT GAG GTC CGC TTG-3' (21-mer)	19	
TGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT	Tabelle2A- breit	21
ATTACCGCGGCTGCTGGCACG	Tabelle2A- breit	22
ACCAGGGTATCTAATCCTGTT	Tabelle2A- breit	23
CACATGCTCCACCGCTTGTC	Tabelle2B- breit	24
TTGCGGGACTTAACCCAACAT	Tabelle 2B- breit	25
CGCGGCTGCTGGCACGTAGTT	Tabelle 3-Gram-positiv	27
ACTTAACCCAACATCTCACGA	Tabelle3-Gram-positiv	28
TTTACGCCAGTAATTCCGA	Tabelle4-Gram-negativ	29
ACTCCATGGTGTGACGGGCGG	Tabelle4-Gram-negativ	30
AATCTGAGCCATGATCAAAC	Tabelle 2A	31
CCCTCTTTGTGCTTGCGACGT	Tabelle 2A	32
ACCCCTCTACGAGACTCAA	Tabelle 2A	33
CCACGCTCAAGGGCACAACC	Tabelle 2A	34
TCTCATCTCTGAAAACCTCCG	Tabelle 2A	35
CATGATCAAACCTTCAATT	Tabelle 2A	36
CCCTCTTTGGTCTTGCGACGT	Tabelle 2A	37
TACCCCTCTACGAGACTCA	Tabelle 2A	38
GCCACGCTCAAGGGCACAAC	Tabelle 2A	39
CAGAGAGCAAGCCCTCTTCAT	Tabelle 2A	40
CCTGCTTTCTCCCGTAGGACG	Tabelle 2A	41
CACCACCTCTGCCATACTCT	Tabelle 2A	42

CTAAGATCTCAAGGATCCCAA	Tabelle 2A	43
GGCCTGCCGCCAGCGTTCAAT	Tabelle 2A	44
CCCTCTTTGGTCCGTAACAT	Tabelle 2A	45
CCCCCTCTACAAGACTCTAGC	Tabelle 2A	46
ACGACTRTAGGTCACAACCTC	Tabelle 2A	47
AGGATCAAACCTCTTATGTTCA	Tabelle 2B	48
CCTGCTTTCCCTCTCAAGACG	Tabelle 2B	49
CACCTCCCTCTGACACACTCG	Tabelle 2B	50
CCAAGCAATCAAGTTGCCCAA	Tabelle 2B	51
CCAGCGTTCATCCTGAGCCAG	Tabelle 2B	52
GAACCATGCGGTTCAAAATAT	Tabelle 2B	53
CTTTCCTCTTCTGCACTCAAG	Tabelle 2B	54
GGGGCGGAAACCCCTAACAC	Tabelle 2B	55
GCATGTGTTAAGCACGCCGCC	Tabelle 2B	56
AAGACATGCATCCCGTGGTCC	Tabelle 2B	57
CAGTCTCCCCTGCAGTACTCT	Tabelle 2B	58
GATCCCAAGGAAGGAAACCCA	Tabelle 2B	59
CAGGATCAAACCTCTCCATAAA	Tabelle 2B	60
AAATCTTTCCCCCGTAGGAGT	Tabelle 2B	61
CACCTACCTCTCCCACACTCT	Tabelle 2B	62
TGGAGAGACTAAGCCCTCCAA	Tabelle 2B	63
CGTCCTGAGCCAGGATCAAAT	Tabelle 2B	64
ATGTCATGCAACATCCACTCT	Tabelle 2B	65
ACTCTCCCCTCTTGCCTCAA	Tabelle 2B	66
AAACCCCGGAAAGGGTCTAAC	Tabelle 2B	67
TCTGAGCCATGATCAAACCTCT	Tabelle 2B	68
ACCCCTTATGAAGCACTGAGT	Tabelle 2B	69
AGTTTCCCTTCCGTAATTCAA	Tabelle 2B	70
CACTGAAGCTCTTGCCCAAC	Tabelle 2B	71
GAACCAAGATCAAATTCTCAG	Tabelle 2C	72
GTTACTCGGATGCCCAAATAT	Tabelle 2C	73
CCTTTTCTCCATCTACCCTCT	Tabelle 2C	74
GGATGGGGTTGAGACCATCCA	Tabelle 2C	75
AGCGTTCATCCTGAGCCAGGA	Tabelle 2C	76
AAATCTTTCTCCAGTAGGACG	Tabelle 2C	77
CACTCACCTCTTCCATACTCA	Tabelle 2C	78
ACTGAGCAGTAAACCACCCAA	Tabelle 2C	79
CATGATCAAACCTCTTCAATTN	Tabelle 2C	80
CACTTTCATCTTCCGATAATA	Tabelle 2C	81
CCTCCCTAAAGTACTCTAGTT	Tabelle 2C	82
CAGAGTTAAACCCCAACCCCC	Tabelle 2C	83
GCCAGCGTTCATCTGAGCCA	Tabelle 2C	84
CCCTCTTTGGTCTTGCGACGT	Tabelle 2C	85
TACCCCCCTCTACGAGACTCA	Tabelle 2C	86
GCCACGCCTCAAGGGCACAAC	Tabelle 2C	87
CCTCGTATCTCTACAAGGTTC	Tabelle 2C	88
CCC CAT CAT TAT GAG TGA TGT GC	AVI-1-23-19	89
TCA TTA TGA G GTG ACC CCA	AVI-1-23-20	90
GAT GAA CAG TTA CTC TCA TC	AVI-1-23-21	91

ACT GAG AGA AGC TTT AAG AG	AVI-1-23-22		92
ATG TGC ACA GTT ACT TAC AC	AVI-1-23-23		93
CTG AGA ACA ACT TTA TGG GA	AVI-1-23-24		94
TTA TTC TGT TGG TAA CGT CA	AVI-1-23-25		95
CG AGT TGC AGA CTG CGA TC	AVI-1-23-26		96
ATC TGA GCC ATG ATC AAA CT	AVI-1-23-27		97
TGT CTC AGT TCC AGT GTT GC	AVI-1-23-28		98
GTC TTC GTC CAG GGG GCC GC	AVI-1-23-29		99
CAC CTG TCT CAC GGT TCC CG	AVI-1-23-30		100
CGC CCT CCC GAA GTT AAG CT	AVI-1-23-31		101
GGC ACG CCG CCA GCG TTC G	AVI-1-23-32	Tab. 10	102
TGT CTC AGT CCC AAT GTG GC	AVI-1-23-33	Tab. 10	103
GTT ACA GAC CAG AGA GCC GC	AVI-1-23-34	Tab. 10	104
CAC CTG TCA CTT TGC CCC CG	AVI-1-23-35	Tab. 10	105
GGC GGC TGG CTC CAA AAG G	AVI-1-23-36	Tab. 10	106
CAC CCG TTC GCC ACT CCT C	AVI-1-23-37	Tab. 10	107
TCA ATT CCT TTG AGT TTC AA	AVI-1-23-38	Tab. 10	108
GCA ATC CGC ACT GAG AGA AGC TTT AAG AG	AVI-1-23-39	Tab. 10	109
C CGC ACT GAG AGA AGC TTT AAG AG	AVI-1-23-40	Tab. 10	110
GAG AGA AGC TTT AAG AG	AVI-1-23-41	Tab. 10	111
G AGA AGC TTT AAG AG	AVI-1-23-42	Tab. 10	112
A AGC TTT AAG AG	AVI-1-23-43	Tab. 10	113
GAC TAC CAG GGT ATC TAA TC	AVI-1-23-44	Tab. 10	114
CAG CGA CAC CCG AAA GCC CC	AVI-1-23-45	Tab. 10	115
GTG CCA AGG CAT CCA CCG TG	AVI-1-23-46	Tab. 11	116
CAT ACT CAA ACG CCC TAT TC	AVI-1-23-47	Tab. 11	117
CCT TAG CCT CCT GCG TCC C	AVI-1-23-48	Tab. 11	118
GGG GTC TTT CCG TCC TGT CG	AVI-1-23-49	Tab. 11	119
CGA TCG ATT AGT ATC AGT CC	AVI-1-23-50	Tab. 11	120
T GAG AGA AGC TTT AAG AG	AVI-1-23-63	Tab. 10	121
CT GAG AGA AGC TTT AAG AG	AVI-1-23-66	Tab. 10	122
GCG ACA CCC GAA AGC GCC	AVI-1-23-67	Tab. 10	123
TAC AGA CCA GAG AGC CGC	AVI-1-23-68	Tab. 10	124
CGA CAC CCG AAA GCG CC	AVI-1-23-69	Tab. 10	125
A GCG ACA CCC GAA AGC GCC	AVI-1-23-70	Tab. 10	126
CG ACA CCC GAA AGC GCC A	AVI-1-23-71	Tab. 10	127
MG AMA MMM GAA AGM GMM	AVI-1-23-72	Tab. 10	128
TAM AGA MMA GAG AGM MGM	AVI-1-23-73	Tab. 10	129
MMM MAM MTT MTT MMG G	AVI-1-23-74	Tab. 10	130
CAC CGC GGC GTG CTG ATC C	AVI-1-23-75	Tab. 10	131
CCC CAC CTT CCT CCG G	AVI-1-23-76	Tab. 10	132
CCG CTT GTG CGG GCC CCC	AVI-1-23-77	Tab. 10	133
CAC CGC GGC GTG CTG ATC	AVI-1-23-78	Tab. 10	134
CAC CGC GGC GTG CTG AT	AVI-1-23-79	Tab. 10	135
ACC GCG GCG TGC TGA TCC	AVI-1-23-80	Tab. 10	136
CCG CGG CGT GCT GAT CC	AVI-1-23-81	Tab. 10	137
ACC GCG GCG TGC TGA TC	AVI-1-23-82	Tab. 10	138
5' - ACG TTG AGG GGC ATC GTC GC-3'	AVI 1-22-126	AS zu c-myc	139

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> AVI BioPharma, Inc.

<120> GEGEN BAKTERIELLE 16S UND 23S RRNAS GERICHTETE UNGELADENE  
ANTISENSE OLIGONUKLEOTIDE UND DEREN VERWENDUNGEN

<130> 0450-0032.41

<140> PCT/US00/42391

<141> 29-11-2000

<150> US 60/168,150

<151> 29-11-1999

<160> 139

<170> FastSEQ für Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1450

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> misc\_feature

<222> 392, 852, 853

<223> n = A,T,C oder G

<400> 1

```

agtttgatca tggctcagat tgaacgctgg cggcaggcct aacacatgca agtcgaacgg      60
taacaggaag cagcttgctg ctttgctgac gagtggcgga cgggtgagta atgtctggga      120
aactgcctga tggaggggga taactactgg aaacggtagc taataccgca taacgtcgca      180
agcacaaaaga gggggacctt agggcctctt gccatcggat gtgccacagat gggattagct      240
agtaggtggg gtaacggctc acctaggcga cgatccctag ctggctgag aggatgacca      300
gcaacactgg aactgagaca cggtcacgac tcctacggga ggcagcagtg gggaatattg      360
cacaatggg ccaagcctga tgcagccatg cngcgtgtat gaagaaggcc tcggggtgt      420
aaagtacttt cagcggggag gaaggagta aagttaatac ctttgctcat tgacgttacc      480
cgcagaagaa gcaccggcta actccgtgcc agcagccgcg gtaatacggg ggtgcaagc      540
gttaatcgga attactgggc gtaaagcgca cgcaggcggg ttgttaagtc agatgtgaaa      600
tccccgggct caacctggga actgcatctg atactggcaa gcttgagtct cgtagagggg      660
ggtagaattc caggtgtagc ggtgaaatgc gtagagatct ggaggaatac cggtgccgaa      720
ggcggceccc tggacgaaga ctgacgctca ggtgcgaaag cgtggggagc aaacaggatt      780
agataccctg gtagtcacac ccgtaaacga tgctcagctt gaggttgtgc ccttgaggcg      840
tggcttcccg annaacgcg ttaagtcgac cgcctgggga gtacggccgc aaggttaaaa      900
ctcaaataaa ttgacggggg cgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgatgcaac      960
gcgaagaacc ttacctggtc ttgacatcca cggaaagttt cagagatgag aatgtgcctt     1020
cgggaaccgt gagacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct cgtgttgtga aatgttgggt     1080
taagtcctcg aacgagcgca acccttatcc tttgttgcca gcggtccggc cgggaactca     1140
aaggagactg ccagtgataa actggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc atcatggccc     1200
ttacgaccag ggctacacac gtgctacaat ggcgcataca aagagaagcg acctcgcgag     1260
agcaagcggg cctcataaaag tgcgtcgtag tccggattgg agtctgcaac tcgactccat     1320
gaagtcggaa tcgctagtaa tcgtggatca gaatgccacg gtgaatacgt tcccgggctt     1380
tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagt gggttgcaaa agaagtaggt agcttaactt     1440
cgggagggcg

```

<210> 2

<211> 1541

<212> DNA

<213> Salmonella thyphimurium

<400> 2

```

aaattgaaga gtttgatcat ggctcagatt gaacgctggc ggcaggccta acacatgcaa      60
gtcgaacggt aacaggaagc agcttgctct ttgctgacga gtggcggacg ggtgagtaat      120
gtctgggaaa ctgcctgatg gagggggata actactggaa acgggtggcta ataccgcata      180
acgtcgcgaag accaaagagg gggaccttcg ggcctcttcg catcggatgt gccagatgg      240
gattagctag taggtgggg aaacggctcac ctaggcgacg atccctagct ggtctgagag      300
gatgaccagc cacactgaaat ctgaaagcacg gtccacagct ctacgggagg cagcagtggg      360
gaatattgca caatgggctc aagcctgatg cagccatgcc gcgtgtatga agaaggcctt      420
cgggttgtaa agtactttca gcggggagga aggtgttggt gtaataaacc gcagcaattg      480
acgttaaccg cagaagaagc accggctaac tccgtgccag cagccgggtt aatacggagg      540
gtgcaagcgt taactcggaa tactggcgtt aaagcgcacg cagggcggtt gttaagtccag      600
atgtgaaatc cccgggctca acctgggaac tgcattctgat actggcaagc ttgagtctcg      660
tagagggggg tagaattcca ggtgtagcgg tgaatgctg agagatctcg aggaataccg      720
gtggcgaaag cggccccctg gacgaagact gacgctcagg tgcgaaacg tggggagcaa      780
acaggattag ataccctggg acgtccacgcc gtaaacgac tctacttggg gcttggtgcc      840
ttgagggcgt gcttccggag ctaacgcgtt aagtagagtg cttggggagt acggccgcaa      900
ggttaaaact caaatgaatt gacgggggccc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt      960
cgatgcaacg cgaagaacct tacctggtct tgacatccac agaactttcc agagatgaga      1020
ttgtgctctt gggaaactgtg agacaggtgc tgcattggctg tcgtcagctc gtgttgtgaa      1080
atgttggggt aagtcccgca acgagcgcaa ccttatcct ttgttgccag cggctccggc      1140
gggaactcaa aggagactgc cagtgataaa ctggaggaa gttgggatga cgtcaagtca      1200
tcatggccct tacgaccagg gctacacacg tctacaatg gcgcatacaa agagaagcga      1260
cctcgcgaga gcaagcggac ctcataaaat gcctcgtagt cccgattgga gtctgcaact      1320
cgactccatg aagtccggaat cgctagttaa cgtggatcag aatgccacgg tgaataccgt      1380
ccccggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagtg ggttgcaaaa gaagtaggta      1440
gcttaacctt cgggagggcg cttaccactt tgtgattcat gactgggggt aagtcgtaac      1500
aaggtaaccc taggggaacc tgcggttggg tcacctcctt a                                1541

```

<210> 3

<211> 1467

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 3

```

attgaagagg cttgctctct gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct aggaatctgc      60
ctgatagtgg gggacaacgt ttcgaaaagg acgctaatac cgcatacgtc ctacgggaga      120
aagcagggga ccttcggggc ttgcgctatc agatgagcct aggtoggatt agctagttag      180
tgaggtaaac gctcaccacg gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg atcagtcaca      240
ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggagggcagc agtggggaat attggacaat      300
ggcgaaaagc ctgatccagc catgcccgtg gttgaaagaa ggtcttcgga ttgtaaaagc      360
ctttaagttg ggaggaaagg cattaaacct atacgttagt gttttgacct taccgcacaga      420
ataagcaccg gctaacttcg tgcccagcagc cgcggttaata cgaagggtgc aagcgttaat      480
cggaaattact gggcgtaaa ggcgcgtagg ttgtttgta agttgaatgt gaaagcccgc      540
ggctcaacct gggaaactgca tccaaaactg gcaagctaga gtaaggcaga gggtegtgga      600
atctcctgtg tagcggtgaa atgcccagat atagggaagg acaccagtg ggaaggcgac      660
cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac      720
cctggtagtc cacgcgcgtaa acgatgtcga ctgcccgttg ggatccttga gatccttagt      780
cgcgagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgctaggtt aaaactctaa      840
tgaattgacg ggggcccgca caagcggtag agcagctggt ttaattcgaa gcaacggcga      900
gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttcagagc atggattggt gccttcggga      960
actctgacac aggtgctgca ttgctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt      1020
cccgtaacga gcgcaacctt tgccttagt taccagcagc ttaagggtgg cactctaagg      1080
agactgcccg tgacaaaacg gaggaaggtg gggatgaggt caagtcatca tggccttac      1140
ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaaagg gttgccaagc cgcgaggtgg      1200
agctaattccc ataaaaccga tcgtagtccg gatggcagtc tgcactcga ctgctggaag      1260
tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga ataccgtccc gggccttcta      1320
cacaccgccc gtcacaccat gggagtgggt tgcctcagaa gtagctagtc taacctcgg      1380
ggggacgggt accacggagg tattcatgac tgggttagaa tcgtaacaag gtagccgtag      1440
gggaacctgc ggctggatca cctcctt

```

<210> 4

<211> 1500

&lt;212&gt; DNA

<213> *Vibrio cholera*

&lt;400&gt; 4

attgaacgct	ggcggcaggg	ctaacacatg	caagtcgagc	ggtaacattt	caaaagcttg	60
cttttgaaga	tgacgagcgg	cggacgggtg	agtaaatggct	gggaacctgc	cctgacgtgg	120
gggataacag	ttggaaacga	ctgctaatac	cgcatgatgt	ttaccgacca	aagaggggga	180
tyttcggacy	tytcgcgctg	ggatggggccc	agttgggatt	agctagtggg	tgagctaata	240
gctcaccaag	gcgacgatcc	ctagctgggt	tgagaggatg	atcagccaca	ctggaaactg	300
gacacggctc	agactcctac	gggaggcagc	agtggggaat	attgcacaat	gggcgcaagc	360
ctgatgcagc	catgcccgtg	gtgtgaagaa	ggccttcggg	ttgtaaagca	ctttcagcag	420
tgaggaaagg	tggtgcgtta	atagcgtatc	aatttgacgt	tagctgcaga	agaagcaccg	480
gctaactccg	tgccagcagc	cgcggttaata	cggaagggtgc	gagcgttaat	cggaaattact	540
gggcgttaag	cgcatgcagg	cggtttgtta	agcaaatgtg	gaaagccccc	ggctcaacct	600
gggaaccgca	ttttgaaactg	gcaggctaga	gtcttctaga	ggggcgtaga	atttcaggtg	660
tagcgggtgaa	atgcgtagag	atctgaagga	ataccgggtg	cgaaggcggc	cccctggaca	720
aagactgacg	ctcagatgcg	aaagcgtggg	gagcaaacag	gattagatac	cctggtagtc	780
cacgctgtaa	acgactgtcta	cttggagggt	gtgaacctara	gtcgtggctt	tcggagctaa	840
cgcgttaagt	agaccgcctg	gggagtacgg	tcgcaagatt	aaaactcaaa	tgaattgacg	900
ggggccccga	caagcgggtg	agcatgtggt	ttaatcogat	gcaacgcgaa	gaaaccttacc	960
tactcttgac	atccagagaa	gccgaaagag	attttgggtg	gccttcggga	actctgagac	1020
aggtgctgca	tggtctgctg	cagctcgtgt	tgtaaatgtg	tggttaagt	cccgcaccca	1080
gogcaacctt	tatccttgtt	tgccagcag	taatgtcggg	aactccaggg	agactgcccg	1140
tgataaacccg	gaggaaaggtg	gggacgacgt	caagtcacca	tgccacctac	gagtagggct	1200
acacacgtgc	tacaatggca	tatacagagg	gcagcggggc	cgccaggtgg	agcgaatccc	1260
agaaagtatg	tcgtagtcgg	gatcggagtc	tgcaactcga	ctccgtgaa	tcggaaatcgc	1320
tagtaatcgt	gaatcagaat	gtcacgggtg	atacgttccc	gggccttcta	cacacccccc	1380
gtcacaccat	gggagtgggc	tgcaaccagaa	gtagatagct	taaccttcgg	gagggcgttt	1440
accacgggtg	ggttcatgac	tgggggtgaa	tcgtaacaag	gtagccctag	gggaacctgg	1500

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1544

&lt;212&gt; DNA

<213> *Neisseria gonorrhoea*

&lt;400&gt; 5

tgaacataag	agttttgatcc	tggctcagat	tgaacgctgg	cgccatgctt	tacacatgca	60
agtcgggacgg	cagcacaggg	aaacttgcct	ctccgggtgg	gagtgggcga	cgggtgagta	120
acatatcggg	acgtaccggg	tagcggggga	taactgatcg	aaagatcagc	taataccgca	180
tacgtcttga	gagggaagac	aggggacctt	cgggccttgc	gctatccgag	cggccgatat	240
ctgatttagct	ggttggcggg	gtaaaggccc	accaaggcga	cgatcagtag	cgggtctgag	300
aggatgatcc	gccacactgg	gactgagaca	cggcccagac	tcttaccgga	ggcagcagtg	360
gggaattttg	gacaatgggc	gcaagcctga	tccagccatg	cgcggtgtct	gaagaaggcc	420
ttcgggttgt	aaaggacttt	tgtcagggaa	gaaaaaggctg	ttgccaatat	cggccggccga	480
tgaacggatcc	tgaagaataa	gcaccgggta	actacgtgcc	agcagccggc	gtaatacgtg	540
gggtgccgagc	gttaatcggg	attactgggc	gtaaagcggg	cgcagacggg	tacctaaagca	600
ggatgtgaaa	tcccggggct	caaccocggg	actgcttctt	gaaactgggtg	actcagagtg	660
gtcagagggga	ggtggaattc	caactgtgag	agtgaatgca	gtagagatgt	ggaggaaatc	720
cgatggcggaa	ggcagcctcc	tgggataaca	ctgacgttca	tgtccgaaag	cgtgggtagc	780
aaacaggtat	agataaccctg	gtagtcacag	ccctaaacga	tgtcaattag	ctgttgggca	840
acttgattgc	ttggtagcgt	agctaaccgg	tgaattgac	cgccctgggga	gtacggctgc	900
aagattaaaa	ctcaaaggaa	ttgacggggg	cccgcacaag	cggtaggatga	tgtggattaa	960
ttcgatgcaa	cgcgaagaac	cttacctggg	tttgacatgt	gcggaatcct	ccgggagcgg	1020
aggagtgcct	tcgggagccg	taaacacagg	gctgcacggc	tgtcgtcagc	tcgtgtcgtg	1080
agatgttggg	ttaaagtcgg	caacgagcgc	aaccttggc	attagttgcc	atcattcggg	1140
tgggcactct	aatgagactg	ccggtgacaa	gccggaggaa	ggtggggatg	acgtcaagtc	1200
ctcatggccc	ttatgaccag	ggcttcacac	gtcatacaat	ggtcgggtaca	gagggtagcc	1260
aagccggcag	gcgagcccaa	tctcacaaaa	tcagctcgtg	tccggattgc	actctgcaac	1320
tcagagtgcac	gaagtccgaa	cgtctagtaa	tcgcaggtca	gcatactcgc	gtgaatacgt	1380
tcccgggtct	tgtacacacc	gcccgtcaca	ccatgggagt	gggggatacc	agaagttaggt	1440
agggtaaccg	caaggagtcc	gcttaccacg	gtatgcttca	tgactggggg	gaagtctgaa	1500
caaggtagcc	gtaggggaa	ctgcccgtgg	atcacctcct	ttct		1544

<210> 6  
 <211> 1484  
 <212> DNA  
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 6  
 ctggctcagg atgaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc aagtcgagcg aacggacgag 60  
 aagcttgcct ctctgatgtt agcggcggac gggtgagtaa cacgtggata acctacctat 120  
 aagactggga taacttcggg aaaccgggagc taataaccaga taatatattg aaccgcatgg 180  
 ttcaaaaagt aaagacggtc ttgctgtcac ttatagatgg atccgcgctg cattagctag 240  
 ttggtaaagt aacggcttac caaggcaacg atgcatagcc gacctgagag ggtgatcgkc 300  
 cacactggaa ctgagacacg gtcacgactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttccg 360  
 caatgggcca aagcctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggtctt cggatcgtaa 420  
 aactctgtta ttagggaaga acatatgtgt aagtaactgt gcacatcttg acggtacctt 480  
 atcagaaaag cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt 540  
 tatccgggat tattgggctg aaagcgcgct taggcccgtt tyaagctct atgtgaaagc 600  
 ccacggctca accgtggagg gtcattggaa actggaaaac ttgagtgcag aagaggaaaag 660  
 tggaaattca tgtgtagcgg tgaattgcgc agagatatgg aggaacacca gtggcgaaag 720  
 cgactttctg gtctgtaact gacgctgatg tgggaaagcg tggggatcaa acaggattag 780  
 ataccctggt agtccacgcc gtaaaccgat agtgctargt gttagggggg tccgcccct 840  
 tagtgctgca gctaaccgat taagcactcc gcctggggag tacgaccgca aggttgaaac 900  
 tcaaaggaaat tgacggggac ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaaagcaac 960  
 gogaagaacc ttaccaaact ttgacatcct ttgacaactc tagagataga gccttcccct 1020  
 tcgggggaca aagtgcacgg ttgtgcatgg ttgtcgtcag ctctgtgctg gagatggttg 1080  
 gtttaagtccc gcaacgagcg caacccttaa gcttagttgc catcattaag ttgggcactc 1140  
 taagttgact gccggtgaca aaccggaggg aggtggggat gacgtcaaat catcatgccc 1200  
 ctatgatatt gggctacaca cgtgctacaa tggacaatac aaagggcagc gaaaccgcga 1260  
 ggtcaagcaa atcccataaa gttgttctca gttcggattg tagtctgcaa ctcgactaca 1320  
 tgaagctgga atcgctagta accgttctac ggtgaaatcg ttcccgggtc 1380  
 ttgtacacac cgcccgctac accacgagag tttgtaaac ccgaagccgg tggagttaac 1440  
 ttttaggagc tagccgtcga aggtgggaca aatgattggg gtga 1484

<210> 7  
 <211> 1464  
 <212> DNA  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 7  
 ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac ggaaaggctc cttcggagat actcagatgg 60  
 cgaacgggtg agtaaacagc gggatgatctg ccttcgactt cgggataagc ctgggaaact 120  
 ggtcttaata ccggatagga ccacgggatg catgtcttgt ggtgaaaagc gcttttagcgg 180  
 tgtgggatga gcccgcggcc tatcagcttg ttggtggggg gacggcctac caaggcgagc 240  
 acgggtagcc ggcctgagag ggtgtccggc cacactggga ctgagatacg gccagactc 300  
 ctacgggagg cagcagtggt gaaatattgca caatgggccc aagcctgatg cagcgaagcc 360  
 gcgtggggga tgacggccct cgggttghtaa acctctttca ccacgacga aggtccgggt 420  
 tctctcggat tgacggtagg tggagaagaa gcaccggcca actacgtgcc agcagcccg 480  
 gtaatacgtg ggggtgcgagc gttgtccgga attactgggc gtaaaagact cgtaggtggt 540  
 ttgtcgcgtt gttcgtgaaa tctcacggct taactgtgag cgtgcggggc atacgggcag 600  
 actagagtac tgcaggggag actggaattc ctggtgtagc ggtggaatgc gcagatatca 660  
 ggaggaacac cgggtggcga ggcgggtctc tgggcagtaa ctgacgctga ggagcgaag 720  
 cgtggggagc gaacaggatt agataccctg gtatgccacg ccgtaaacgg tgggtactag 780  
 gttgtgggtt ccttccctgg gatccgtgcc gtagctaacg cattaagtac cccgcctggg 840  
 gagtacggcc gcaaggctaa aactcaaaag aattgacggg ggcccgcaca agcggcggag 900  
 catgtggatt aattcagatg aacgcgaaga acctaacctg ggtttgacat gcacaggagc 960  
 cgtctagaga taggcgtacc ctgtggcct gtgtgcaggt ggtgcattgg tctcgtcagc 1020  
 tcgtgtcgtg agatgltggg ttaagtcocg caacgagcgc aaccctgtc tcatggtgcc 1080  
 agcacgtaat ggtggggact cgtgagagac tgcgggggtc aactcggagg aaggtgggga 1140  
 tgacgtcaag tcatcagcnc ctttatgtcc agggcttcac acatgctaca atggccggt 1200  
 caaagggctg cgatgcnngg aggttaagcg aatccttaaa agccggtctc agttcggatc 1260  
 ggggtctgca actcgambcc gtgaagtcgg agtcgctagt aatcgcagat cagcaacgct 1320  
 gcggtgaata cgttcnnggg cttgttacac accgcccctc acgtcatgaa agtcggtaac 1380

acccgaagcc agtggcctaa cctcggggag ggagctgtcg aaggtgggat cggcgattgg 1440  
 gacgaagtcg taacaaggta gccg 1464

<210> 8  
 <211> 1450  
 <212> DNA  
 <213> Helicobacter pylori

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 912, 927, 928, 929, 930, 1083  
 <223> n = A,T,C oder G

<400> 8  
 tttatggaga gtttgcctcct ggctcagagt gaaagctggc ggcgtgccta atacatgcaa 60  
 gtcgaacgat gaagcttcta gcttgctaga gtgctgatta gtggcgacg ggtgagtaac 120  
 gcataggtca tgtgcctcct agtttgggat agccattgga aacgatgatt aataccagat 180  
 actcctacgg gggaaagatt tatcgcctaag agatcagcct atgtcctatc agcttgttgg 240  
 taaggtaatg gcttaccaag gctatgacgg gtatccggcc tgagaggggtg aacggacaca 300  
 ctggaaactga gacacggctc agactcctac gggaggcagc agtagggaat attgctcaat 360  
 gggggaaacc ctgaagcagc aacggccgct ggaggatgaa ggttttagga ttgtaaaactc 420  
 cttttgttag agaagataat gacggatctt aacgaataag caccggctaa ctccgtgcca 480  
 gcagccggcg taatacggag ggtgcaagcg ttactcggaa tcaactggcg taaagagcgc 540  
 gtaggcggga tagtcagtcg ggtgtgaaat cctatggctt aaccatagaa ctgcatttga 600  
 aactactatt ctagagtgtg ggagaggtag gtggaattct tgggttaggg gtaaaatccg 660  
 tagagatcaa gaggaatact cattgcgaag gcgacctgct ggaacattac tgacgctgat 720  
 tgcgctaaag cgtggggagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccctaaacga 780  
 tggatgctag ttgttggagg gcttagtctc tccagtaatg cagctaacgc attaagcatc 840  
 ccgcctgggg agtacggctg caagattaaa actcaaaagg atagacgggg acccgcacaa 900  
 gcgggtggagc angtggttta attcgannnn acacgaagaa ccttacctag gcttgacatt 960  
 gagagaatcc gctagaaata gtggagtgtc tagcttgccta gacctgaaa acagggtgctg 1020  
 cacggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac gagcgcaacc 1080  
 cctttcttta gttgctaaca ggttatgctg agaactctaa ggatactgcc tccgtaagga 1140  
 ggaggaagggt ggggacgagc tcaagtcacg atggccctta cgcctagggc tacacacgtg 1200  
 ctacaatggg gtgcacaaag agaagcaata ctgtgaagtg gagccaatct tcaaaacacc 1260  
 tctcagttcg gattgtaggc tgcaactcgc ctgcatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc 1320  
 aaatcagcca tgttgcggtg aatacgttcc cgggtcttgt actcaccgcc cgtcacacca 1380  
 tgggagttgt gtttgcotta agtcagggatg ctaaatggc tactgcccac ggcacacaca 1440  
 gcgactgggg 1450

<210> 9  
 <211> 1515  
 <212> DNA  
 <213> Streptococcus pneumoniae

<400> 9  
 atttgatcct ggctcaggac gaaagctggc ggcgtgccta atacatgcaa gtagaacgct 60  
 gaaggaggag cttgcttctc tggatgagtt gcaaacgggt gagtaacgag taggtaacct 120  
 gcctggtagc ggggataaac tatggaaac gatagctaata accgcataag agtggatgtt 180  
 gcatgacatt tgcttaaaag gtgcacttgc atcaactacca gatggacctg cgttgtatta 240  
 gctagttggt ggggtaacgg ctcaaccaag cgacgataca tagccgacct gagaggggtga 300  
 tcggccacac tgggactgag acacgkcca gactcctacg ggaggcagca gtagggaatc 360  
 ttccgcaatg gacggaagtc tgaccgagca accccgctg agtgaagaag gttttcggat 420  
 cgtaaagctc tgttgtaaag gaagaacgag tgtgagagtg gaaagttcac actgtgacgg 480  
 tatcttacca gaaaggagc gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtccc 540  
 gagcgttgtc cggatttatt gggcgtaaaag cgagcgcagg cggttagata agtctgaagt 600  
 taaaggctgt ggctcaacca tagtaggctt tggaaactgt ttaacttgag tgcaagaggg 660  
 gagagtggaa ttccatgtgt agcgggtgaaa tgcgtagata tatggaggaa caccgggtggc 720  
 gaaagcggct ctctggcttg taactgacgc tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg 780  
 attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa cgatgagtg taggtgttag accctttccg 840  
 gggtttagtg ccgtagctaa cgcattaaag actccgctcg gggagtacga ccgcaagggtt 900  
 gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgca caagcgtgg agcatgtggt ttaattcgaa 960

```

gcaacgcgaa gaaccttacc aggtcctgac atccctctga ccgctctaga gatagagttt. 1020
tccttcggga cagaggtgac aggtgggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1080
tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacccc tattgttagt tgccatcatt cagttgggca 1140
ctctagcgag actgccggtg ataaaccgga ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg 1200
ccccttatga cctgggctac acacgtgcta caatggctgg tacaacgagt cgcaagccgg 1260
tgacggcaag ctaatctctt aaagccagtc tcagttcggg ttgtaggctg caactcgcct 1320
acatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgcg atcagcaagc cgcggtgaat acgttcccgg 1380
gccttgatac caccgcccgt cacaccaoga ggtttgtaa caccggaag cgttgaggta 1440
accgtaagga gccagccgcc taagtgggga tagatgatt gggtgaagtc gtaacaagg- 1500
cagccgtttg ggaga 1515

```

<210> 10  
 <211> 1544  
 <212> DNA  
 <213> *Treponema palladium*

```

<400> 10
agagtttgat catggctcag aacgaacgct gggggcgcgt ctaagcatg caagtcgaac 60
ggcaagagag gagcttgctt ctctcctaga gtggcggact ggtgaggaa acgtgggtaa 120
tctaccctta agatggggat agctgctaga aatagcaggt aataccgaat atactcagtg 180
cttcataaag ggtattgagg aaaggaagct acggcttcgc ttgaggatga gcttgcgtcc 240
cattagctag ttggtgaggt aaaggcccac caagggcagc atgggtatcc ggctgagag 300
ggtgatcrga cacattggga ctgagatacg gcccaaacct ctacgggagg cagcagctaa 360
gaaatattcc caatgggacg aagtctgacg gagcgaagcc gcgtggatga agaagctga 420
aaagttgtaa aatccttttg ttgatgaaga ataagggtag gaggaatgc tcatctgatg 480
acggtaatcg acgaataagc ccccgcta at tacgtgccag cagcccggt aacacgtaag 540
ggcgagcgt tgttcggaat tattggcggt aaagggcatg tagggggtta tgaagcctg 600
atgcaaaatc ctggggctta accccagaat agcattgggt actgtgtaac ttgaattacg 660
gaagggaaac tggaaattcca agtgtagggg tggaaatctg agatatttg aagaacaccg 720
gtggcgaagg cgggtttctg gccgataatt gacgctgaga tgcgaaagtg tggggatcga 780
acaggattag ataccctggt agtccacacc gtaaaccgat tcaactaggt gttggggcaa 840
gagcttcaag gccaaagcaa acgcgataag tgtaccgctt ggggagtag cccgcaaggg 900
tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcgtg gagcatgtg ttaattcga 960
tggtacgca ggaaccttac ctgggttga catctagtag aaggtctag aga-aaggcc 1020
gggtagcaat accctgctag acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gccgtgaggt 1080
gttgggttaa gtcccgcaat gagcgcgaacc cctactgcca gttactaaca ggtaaagctt 1140
gaggactctg gcggaactgc cgatgacaaa tcggaggaag gtggggatga cgtcaagctca 1200
tcatggccct tatgtccagg gctacacacg tgctacaatg sttgctacaa agcgaagcaa 1260
gaccgtaagg tggagcaagc cgcaaaaag caatcgtagt tggattgaa gtcctgaaact 1320
cgacttcatg aagttggaat cgctagtaat cgcgcacag caccggcggg tgaatacgtt 1380
cccggcctt gtacacaccg cccgtcacac catccgagtt gggggtacc gaagtcgctt 1440
gtctaacctg caaagagga ggtgcccga ggtaccgtt gtaaggagg tgaagtcgta 1500
acaaggtagc cgtaccgaa ggtgocgctg gatcaccctc ttaa 1544

```

<210> 11  
 <211> 1548  
 <212> DNA  
 <213> *Chlamydia trachomatis*

```

<400> 11
ctgagaattt gatcttggtt cagattgaac gctggcggcg tgcattgagg atgcaagtcg 60
aacggagcaa ttgtttcggc aattgtttag tggcggaaag gttagtaatg catagataat 120
ttgtccttaa cttgggaata acggttgga acggccgcta ataccgaatg tggcgatatt 180
tgggcatccg agtaacgtta aagaagggga tcttaggacc tttcgggtta gggagagtct 240
atgtgatatc agctagttag tggggtaaa gctaccaaag gctatgacgt ctaggcggat 300
tgagagattg gccgcaaca ctgggactga gacactgcc agactcctac gggaggctgc 360
agtcgagaat ctttcgcaat ggacggaagt ctgacgaagc gacggcgcgt gtgtgatgaa 420
ggctctaggg ttgtaaagca ctttcgcttg ggaataagag aagacggtta ataccgctg 480
gatttgagcg taccaggtaa agaagcaccg gctaactccg tgcagcagc tgcgtaata 540
cggagggtgc tagcgttaat cggatattat ggcggtaaag gtcgtgtag cggaaaggta 600
agttagttgt caaagatcgg ggctcaacc cgagtcgca tctataacta ttttctaga 660
gggtagatgg agaaaaggga atttcacgtg tagcgggtgaa atgcttagat atgtggaaga 720

```

```

acaccagtgg cgaaggcgct tttctaattt atacctgacg ctaaggcgcg aaagcaaggg 780
gagcaaacag gattagatac cctggtagtc cttgccgtaa acgatgcata cttgatgagg 840
atggtctcaa cccatccgt gtcggagcta acgcgtaa tatgcccct gaggagtaca 900
ctcgcaaggg tgaactcaa aagaattgac gggggcccgc acaagcagtg gagcatgtgg 960
ttaattcga tgcaacgca aggaccttac ctgggtttga catgtatatg accgcccag 1020
aaatgctcgt tccgcaagg acatatacac aggtgctgca tggctgctgt cagctcgtgc 1080
cgtgaggtgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct tatcgttagt tgccagcact 1140
tagggtggga actctaacga gactgcctgg gttaaccagg aggaaggcga ggatgacgtc 1200
aagtcagcat ggcccttatg cccagggcga cacacgtgct acaatggcca gtacagaagg 1260
tagcaagatc gtgagatgga gcaaatcctc aaagctggcc ccagtccgga ttgtagtctg 1320
caactcgact acatgaagtc ggaattgcta gtaatggcgt gtcagccata acgcccgtga 1380
tacgttcccg ggccttgta cacaaccgag tcacatcatg ggagtgggt ttacctaaag 1440
tcgttgactc aaccgcgaag gagagaggcg ccaaggtga ggctgatgac taggatgaag 1500
tcgtaacaag gtagccctac cgaagggtgg ggctggatca cctccttt 1548

```

```

<210> 12
<211> 1466
<212> DNA
<213> Bartonella henselae

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 1311
<223> n = A,T,C oder G

```

```

<400> 12
tcctggctca ggatgaacgc tggcggcagg cttaacacat gcaagtcgag cgcactcatt 60
tagagtgagc ggcagacggg tgagttaacg gtgggaatct accctttct acggaataac 120
acagagaaat ttgtgctaata accgtatacg tcctactgga gaaagattta tcggagaagg 180
atgagcccgc gttggattag ctagtttggt aggtaaaggg tcaccaaggc gacgatccat 240
agctggtctg agaggatgat cagccacact gggactgaga cacggcccag actcctacgg 300
gaggcagcag tggggaatat tggacaatgg gggcaaccct gatccagcca tgcccgctga 360
gtgatgaagg ccctagggtt gtaaagctct ttcacgggtg aagataatga cggtaaccgg 420
agaagaagcc cgggctaact tcgtgccagc agcccggtta atacgaaggg ggctagcgtt 480
gttcggatth actgggcgta aagcgcattg aggcggatat ttaagtcaga ggtgaaatcc 540
cagggtctaa ccctggaact gcctttgata ctggatatct tgagtatgga agaggtgagt 600
ggaattccga gtgtagaggt aaaattcgtg gatattcggg ggaacaccag tggcgaaggc 660
ggctcactgg tccattactg acgctgaggt gcgaaaagcgt ggggagcaaa caggattaga 720
taccctggta gtccacgccc taaacgatga atgttagccg ttgggtggtt tactgctcag 780
tggcgcacgt aacgcatata acatccgcc tgggagtagc ggtcgcgaaga ttaaaactca 840
aaggaaatga cgggggcccg cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgag 900
cagaacctta ccagcccttg acatcccgat cgcgggaagt ggaacacccc tccttcagtt 960
cggctcgatc ggagacaagg gctgcatggc tgtcgtcagc tcgtgctgtg agatgttggg 1020
ttaagtcccg caacgagcgc aaccctcgcc cttagttgcc agcattcagt tgggcactct 1080
agggggactg ccggtgataa gccgagagga aggtggggat gacgtcaagt cctcatggcc 1140
cttacgggct gggctacaca cgtgctacaa tgggtgtgac agtgggcagc gagatcgcaa 1200
ggtcgagcta atctccaaaa gccatctcag ttcggattgc actctgcaac tcgagtgcac 1260
gaagttggaa tcgctagtaa tcgtggatca gcatgctacg gtaaatcgt ncccggccct 1320
tgtacacacc gcccgctaca ccatgggagt tgggtttacc cgaagggtgt gtgctaaccg 1380
caaggaggca gstaaccacg gtagggtcag cgactggggt gaagtctgaa caaggtagcc 1440
gtagggaacc tgcggctgga tcacct 1466

```

```

<210> 13
<211> 1487
<212> DNA
<213> Hemophilis influenza

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 1, 373, 541, 629, 930, 1182, 1387
<223> n = A,T,C oder G

```

<400> 13

naattgaaga	gtttgatcat	ggctcagatt	gaacgctggc	ggcaggctta	acacatgcaa	60
gtcgaacggg	agcaggagaa	agcttgctt	cttgctgacg	agtggcggac	gggtgagtaa	120
tgcrtgggaa	tctggcttat	ggagggggat	aacgacggga	aactgtcgc	aataccgcgt	180
attatcggaa	gatgaaagt	cgggactgag	aggccgcgat	ccataggatg	agcccaagt	240
ggattaghta	gttgggtggg	taaatgccta	ccaagcctgc	gatctctagc	tggctcgaga	300
ggatgaccag	ccacactgga	actgagacac	ggtccagact	cctacgggag	gcagcagtgg	360
ggaatattgc	gcnatggggg	gaaccctgac	gcagccatgc	cgctggaatg	aagaaggcct	420
tccgggttga	aagtctcttc	ggtattgagg	aagggtgatg	tgtaaatagc	acatcaaatt	480
gacgttaaat	acagaagaag	caccggctaa	ctccgtgcca	gcagccgcgg	taatacggag	540
ngtgcgagcg	ttaatcggaa	taactgggcg	taaagggcac	gcaggcgggt	atttaagtga	600
ggtgtgaaag	ccccgggctt	aacctgggna	ttgcatttca	gactgggtaa	ctagagtact	660
ttagggaggg	gtagaattcc	acgtgtagcg	gtgaaatgcg	tagagatgtg	gaggaatacc	720
gaagcgaag	gcagcccctt	gggaatgtac	tgacgctcat	gtcgaagaag	gtggggagca	780
aacaggatta	gataccctgg	tagtccacgc	tgtaaacgct	gtcgatttgg	gggttgggg	840
ttaactctgg	caccctgtagc	taacgtgata	aatcgaccgc	ctggggagta	cgcccgcaag	900
gttaaaactc	aaatgaattg	acgggggcn	gcaacaagcg	tggagcatgt	ggtttaattc	960
gatgcaacgc	gaagaacctt	acctactctt	gacatcctaa	gaagagctca	gagatgagct	1020
tgtgccttcg	ggaacttaga	gacagggtgct	gcattggctgt	cgtcagctcg	tgttgtgaaa	1080
tgttgggtta	agtcocgcaa	cgagcgcac	ccttctcctt	tgttgccagc	gacttggctc	1140
ggaactcaaa	ggagactgcc	agtgataaac	tggaggaagg	tngggatgac	gtcaagtcat	1200
catggccctt	acgagtaggg	ctacacacgt	gctacaatgg	cgtatacaga	gggaagcga	1260
gctgcgaggt	ggagcgaatc	tcaataagta	cgtctaagtc	cggtattggag	tctgcaactc	1320
gactccatga	agtccggaatc	cctagtaatc	gcgaatcaga	atgtcgcggt	gaatacgttc	1380
ccggcctttg	tacacaccgc	cctcacacc	atgggagtg	gttgtaccag	aagtagatag	1440
cttaaccttt	tggagggcgt	ttaccacggt	atgattcatg	actgggg		1487

<210> 14

<211> 1487

<212> DNA

<213> *Shigella dysenterae*

<400> 14

tggctcagat	tgaacgctgg	cggcaggcct	aacacatgca	agtcgaacgg	taacagaaa	60
cagcttgctg	tttgcctgac	agtggcggac	gggtgagtaa	tgtctgggaa	actgcctgat	120
ggagggggat	aactactgga	aacggtagct	aataccgcct	aacgtcgcaa	gaccaaagag	180
ggggacccttc	gggctctctg	ccatcggatg	tgcccagatg	ggattagcta	gtaggtgggg	240
taacggctca	ccttagcgcg	gatccctagc	tggtctgaga	ggatgaccag	ccacactgga	300
actgagacac	ggtccagact	cctacgggag	gcagcagtgg	ggaatattgc	acaatggcgg	360
caagcctgat	gcagccatgc	cgctgtgatg	aagaaggcct	tccgggttga	aagtactttc	420
agcgggggag	aaggagtaga	agttaatacc	tttgcctcatt	gacgttacc	gcagaagaag	480
caccggctaa	ctccgtgcca	gcagccgcgg	taatacggag	ggtgcaacgg	ttaatcggaa	540
ttactggggc	taaagcgcac	gcaggcgggt	tgtaagtca	gatgtgaaat	ccccgggctc	600
aacctgggaa	ctgcatctga	tactggcaag	ctttagctctc	gtagaggggg	gtagaattcc	660
aggtgtagcg	gtgaaatcgc	tagagatctg	gaggaatacc	ggtggcgaag	gcggccccct	720
ggacgaaaa	tgacgctcag	gtcgaagaag	gtggggagca	aacaggatta	gataccctgg	780
tagtccacgc	cgtaaacgat	gtcgacttgg	aggttgtgcc	cttgaggcgt	ggcttccgga	840
gctaaccgct	taagtgcgac	gctggggag	taccgccgca	aggttaaac	tcaaatgaat	900
tgaacggggc	ccgcacaagc	ggtggagcat	gtggtttaat	tcgatgcaac	gcgaagaacc	960
ttacctggtc	ttgacatcca	cagaaccttg	tagagatacg	aggggtgcct	cgggaaactgt	1020
gagacaggtg	ctgcatggct	gtcgtcagct	cgtgttgtga	aatgttgggt	taagtccccg	1080
aacgagcgc	accttatcc	tttgttgcca	gcggtccggc	cgggaaactca	aaggagactg	1140
ccagtataaa	actggaggaa	ggtggggatg	acgtcaagtc	atcatggccc	ttacgaccag	1200
ggctacacac	gtgctacaat	ggcgataca	aagagaagcg	acctcgcgag	agcaagcgg	1260
cctcataaag	tgcgtcgtag	tccggattgg	agtctgcaac	tcgactccat	gaaqtccgaa	1320
tcgctagtaa	tcgtggatca	gaatgtcacg	gtgaatacgt	tcccgggcct	tgtacacacc	1380
gcccgtcaca	ccatgggagt	gggttgcaaa	agaagtaggt	agcttaacct	tccggagggc	1440
gcttaccact	ttgtgattca	tgactgggg	gaagtcgtaa	caaggra		1487

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer

<400> 15

ggactacgac gcactttatg ag

22

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer

<400> 16

ggtcgcttg ctctcgcgag g

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer

<400> 17

gcaaaggat taactttact c

21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer

<400> 18

gctgcggtta ttaaccacaa c

21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer

<400> 19

gcactttatg aggtccgctt g

21

<210> 20

<211> 4

<212> DNA

<213> Unbekannt

<220>

<223> Keine Sequenz ist vorhanden

<400> 20

000

<210> 21  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 21  
 tgctgcctcc cgtaggagtc t 21  
  
 <210> 22  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 22  
 attaccgcgg ctgctggcac g 21  
  
 <210> 23  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 23  
 accagggtat ctaatcctgt t 21  
  
 <210> 24  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 24  
 cacatgctcc accgcttgctg c 21  
  
 <210> 25  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 25  
 ttgcgggact taaccaaca t 21  
  
 <210> 26  
 <211> 4  
 <212> DNA  
 <213> Unbekannt  
  
 <220>

<223> Keine Sequenz ist vorhanden

<400> 26  
000

<210> 27  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Antisense-Oligomer

<400> 27  
cgcggtgct ggcacgtagt t 21

<210> 28  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Antisense-Oligomer

<400> 28  
acttaacca acatctcacg a 21

<210> 29  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Antisense-Oligomer

<400> 29  
tttagccca gtaattccga 20

<210> 30  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Antisense-Oligomer

<400> 30  
accccatgg tgtgacgggc gg 22

<210> 31  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Antisense-Oligomer

<400> 31  
aatrtgagcc atgatcaaac t 21

<210> 32  
<211> 21

<212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 32  
 ccctctttgt gcttgagacg t 21  
  
 <210> 33  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 33  
 accccctct acgagactca a 21  
  
 <210> 34  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 34  
 ccacgcctca agggcacaac c 21  
  
 <210> 35  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 35  
 tctcatctct gaaaacttcc g 21  
  
 <210> 36  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 36  
 catgatcaaa ctcttcaatt t 21  
  
 <210> 37  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 37

ccctccttgg tcttgcgacg t 21

<210> 38  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 38  
 taccocccctc tacgagactc a 21

<210> 39  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 39  
 gccacgcctc aagggcacia c 21

<210> 40  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 40  
 cagagagcaa gccctcttca t 21

<210> 41  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 41  
 cctgccttct ccgtaggac g 21

<210> 42  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 42  
 caccaccctc tgccatactc t 21

<210> 43  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 43  
 ctaagatctc aagatocca a 21  
  
 <210> 44  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 44  
 ggccctgccgc cagcgttcaa t 21  
  
 <210> 45  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 45  
 cccctctttgg tccgtaaaca t 21  
  
 <210> 46  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 46  
 cccccctctac aagactctag c 21  
  
 <210> 47  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 47  
 acgactytag gtcacaacct c 21  
  
 <210> 48  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 48  
 aggatcaaac tcttatgttc a 21  
  
 <210> 49

<211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 49  
 cctgctttcc cctcaagac g 21

<210> 50  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 50  
 cacctccctc tgacacactc g 21

<210> 51  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 51  
 ccaagcaatc aagttgccca a 21

<210> 52  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 52  
 ccagcgttca tcttgagcca g 21

<210> 53  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 53  
 gaaccatgcg gttcaaaata t 21

<210> 54  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 54  
 ctctctctct ctgcactcaa g 21

<210> 55  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 55  
 ggggaggaaa cccctaaca c 21

<210> 56  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 56  
 gcatgtgta agcacgggc c 21

<210> 57  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 57  
 aagacatgca tcccgtggtc c 21

<210> 58  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 58  
 cagtctccc tgcagtactc t 21

<210> 59  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 59  
 gatcccaagg aaggaaacc a 21

<210> 60  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 60  
 caggatcaaa ctctccataa a 21  
  
 <210> 61  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 61  
 aaatctttcc ccctaggag t 21  
  
 <210> 62  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 62  
 cacctacctc tccacactc t 21  
  
 <210> 63  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 63  
 tggagagact aagccctcca a 21  
  
 <210> 64  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 64  
 cgtcctgagc caggatcaaa t 21  
  
 <210> 65  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 65  
 atgtcatgca acatccactc t 21

<210> 66  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 66  
 actctcccct cttgactca a 21  
  
 <210> 67  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 67  
 aaaccccgga aagggcttaa c 21  
  
 <210> 68  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 68  
 tctgagccat gatcaaactc t 21  
  
 <210> 69  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 69  
 accccttatg aagcactgag t 21  
  
 <210> 70  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 70  
 agtttccctt ccgtaattca a 21  
  
 <210> 71  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 71  
 cactgaagct cttgcccaca c 21

<210> 72  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 72  
 gaaccaagat caaattctca g 21

<210> 73  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 73  
 gttactcggg tgcccacaata t 21

<210> 74  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 74  
 cctttctctc atctaccctc t 21

<210> 75  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 75  
 ggatgggggt gagaccatcc a 21

<210> 76  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 76  
 agcgttcctc ctgagccagg a 21

<210> 77  
 <211> 21  
 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer

<400> 77  
aaatctttct ccagtaggac g 21

<210> 78  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer

<400> 78  
cactcacctc ttccatactc a 21

<210> 79  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer

<400> 79  
actgagcagt aaaccaccca a 21

<210> 80  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer

<221> misc\_feature  
<222> 21  
<223> n = A, T, C oder G

<400> 80  
catgatcaaa ctcttcaatt n 21

<210> 81  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer

<400> 81  
cactttcatc ttccgataat a 21

<210> 82  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer  
 <400> 82  
 cctccctaaa gtactctagt t 21  
 <210> 83  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
 <400> 83  
 cagagttaaa cccaacccc c 21  
 <210> 84  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
 <400> 84  
 gccagcgttc aatctgagcc a 21  
 <210> 85  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
 <400> 85  
 ccctctttgg tcttgagcg t 21  
 <210> 86  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
 <400> 86  
 tacccccctc tacgagactc a 21  
 <210> 87  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
 <400> 87  
 gccacgcctc aagggcacia c 21  
 <210> 88  
 <211> 21

<212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 88  
 cctcgtatct ctacaagggt c 21  
  
 <210> 89  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 89  
 ccccatcatt atgagtgatg tgc 23  
  
 <210> 90  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 90  
 tcattatgag gtgacccca 19  
  
 <210> 91  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 91  
 gatgaacagt tactctcatc 20  
  
 <210> 92  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 92  
 actgagagaa gctttaagag 20  
  
 <210> 93  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 93

atgtgcacag ttacttacac	20
<210> 94	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Antisense-Oligomer	
<400> 94	20
ctgagaacaa ctttatggga	
<210> 95	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Antisense-Oligomer	
<400> 95	20
ttattctggt ggtaacgtca	
<210> 96	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Antisense-Oligomer	
<400> 96	19
cgagttgcag actgcgatc	
<210> 97	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Antisense-Oligomer	
<400> 97	20
atctgagcca tgatcaaact	
<210> 98	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Antisense-Oligomer	
<400> 98	20
tgtctcagtt ccagtgttgc	
<210> 99	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 99  
 gtcttcgtcc agggggccgc 20  
  
 <210> 100  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 100  
 cacctgtctc acggtcccg 20  
  
 <210> 101  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 101  
 cgccctcccg aagttaagct 20  
  
 <210> 102  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 102  
 ggcacgccgc cagcgttcg 19  
  
 <210> 103  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 103  
 tgtctcagtc ccaatgtggc 20  
  
 <210> 104  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 104  
 gttacagacc agagagccgc 20  
  
 <210> 105

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 105  
 cacctgtcac ttgcccccg 20

<210> 106  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 106  
 ggcggctggc tcacaaaagg 19

<210> 107  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 107  
 caccggttcg ccactcctc 19

<210> 108  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 108  
 tcaattcctt tgagtttcaa 20

<210> 109  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 109  
 gcaatccgaa ctgagagaag ctttaagag 29

<210> 110  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 110 ccgaactgag aqaagcttta agag	24
<210> 111 <211> 17 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<220> <223> Antisense-Oligomer	
<400> 111 gagagaagct ttaagag	17
<210> 112 <211> 15 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<220> <223> Antisense-Oligomer	
<400> 112 gagaagcttt aagag	15
<210> 113 <211> 12 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<220> <223> Antisense-Oligomer	
<400> 113 aagctttaag ag	12
<210> 114 <211> 20 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<220> <223> Antisense-Oligomer	
<400> 114 gactaccagg gtatctaatac	20
<210> 115 <211> 20 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<220> <223> Antisense-Oligomer	
<400> 115 cagcgacacc cgaagcgcc	20
<210> 116 <211> 20 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 116  
 gtgccaaggc atccaccgtg 20

<210> 117  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 117  
 cataactcaaa cgccctatcc 20

<210> 118  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 118  
 ccttagcctc ctgcgtccc 19

<210> 119  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 119  
 ggggtccttc cgtcctgtcg 20

<210> 120  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 120  
 cgatcgatta gtatcagtcc 20

<210> 121  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 121  
 tgagagaagc ttaagag 18

<210> 122  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 122  
 ctgagagaag ctttaagag 19  
  
 <210> 123  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 123  
 gcgacaccgc aaagcgcc 18  
  
 <210> 124  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 124  
 tacagaccag agagccgc 18  
  
 <210> 125  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 125  
 cgacaccgga aagcgcc 17  
  
 <210> 126  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer  
  
 <400> 126  
 agcgacaccg gaaagcgcc 19  
  
 <210> 127  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Antisense-Oligomer

<400> 127 cgacaccgga aagcgcc	18
<210> 128 <211> 17 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<220> <223> Antisense-Oligomer	
<400> 128 mgamamunga aagmgn	17
<210> 129 <211> 18 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<220> <223> Antisense-Oligomer	
<400> 129 tamagamag agagmgn	18
<210> 130 <211> 16 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<220> <223> Antisense-Oligomer	
<400> 130 numnamnttm mtrngg	16
<210> 131 <211> 19 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<220> <223> Antisense-Oligomer	
<400> 131 caccgcggcg tgctgacc	19
<210> 132 <211> 16 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<220> <223> Antisense-Oligomer	
<400> 132 cccaccttc ctccgg	16
<210> 133 <211> 18 <212> DNA	

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer

<400> 133

ccgcttgtgc gggccccc

18

<210> 134

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer

<400> 134

caccgaggcg tgctgatc

18

<210> 135

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer

<400> 135

caccgaggcg tgctgat

17

<210> 136

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer

<400> 136

accgaggcgt gctgatcc

18

<210> 137

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer

<400> 137

ccgaggcgtg ctgatcc

17

<210> 138

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Oligomer

<400> 138

accgaggcgt gctgatc

17

<210> 139  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Antisense Oligomer

<400> 139  
 acgttgaggg gcatcgtcgc

20

### Patentansprüche

1. Antibakterielle Verbindung, bestehend aus einem im Wesentlichen ungeladenen Antisense-Oligomer, das 10 bis 40 Nucleotid-Untereinheiten enthält, wobei jede der Untereinheiten einen Morpholinring umfasst, der eine basenpaarbildende Einheit trägt, die wirksam ist, mittels Watson-Crick-Paarung an eine entsprechende Nucleotidbase zu binden, wobei das Antisense-Oligomer eine Nucleinsäurezielsequenz mit einer Länge von mindestens 10 Nucleotiden umfasst, die in der Lage ist, mit einer bakteriellen 16S- oder 23S-rRNA-Nucleinsäuresequenz stabil zu hybridisieren, wobei angrenzende Untereinheiten durch ungeladene Bindungen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus ungeladenen Phosphoramidat- und Phosphordiamidatbindungen, oder durch geladene Phosphoramidatbindungen verbunden sind, wobei das Verhältnis von ungeladenen Bindungen zu geladenen Bindungen in dem Oligomer zumindest 4:1 ist.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei das Oligomer in der Lage ist, mit der bakteriellen Sequenz bei einem  $T_m$ -Wert zu hybridisieren, der wesentlich höher ist als der  $T_m$ -Wert eines Duplexes, der aus einer entsprechenden DNA und der gleichen bakteriellen Sequenz zusammengesetzt ist.

3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Oligomer in der Lage ist, bei einem  $T_m$ -Wert, der wesentlich größer ist als  $37^\circ\text{C}$ , mit der bakteriellen Sequenz zu hybridisieren.

4. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die ungeladenen Bindungen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus den Strukturen, wie dargestellt in [Fig. 2A](#) bis [Fig. 2D](#), wobei X Fluor, ein Alkyl oder substituiertes Alkyl, ein Alkoxy oder substituiertes Alkoxy, ein Thioalkoxy oder substituiertes Thioalkoxy oder ein unsubstituierter, monosubstituierter oder disubstituierter Stickstoff ist; Z Schwefel oder Sauerstoff ist;  $Y_1$  in [Fig. 2B](#) und [Fig. 2D](#) Schwefel, Stickstoff, Kohlenstoff oder Sauerstoff ist und  $Y_2$  in [Fig. 2C](#) Methylen, Schwefel oder Sauerstoff ist; und jedes  $P_i$  und  $P_j$  eine Purin- oder Pyrimidinbasenpaarbildende Einheit ist, die wirksam ist, mittels basenspezifischer Wasserstoffbindung an eine Base in einem Polynucleotid zu binden.

5. Verbindung nach Anspruch 4, wobei jede ungeladene Bindung eine Phosphordiamidatbindung wie dargestellt in [Fig. 2B](#) ist, wobei  $X = \text{NR}_2$ , wobei R Wasserstoff oder Methyl ist,  $Y_1$  Sauerstoff ist und Z Sauerstoff ist.

6. Verbindung nach Anspruch 3, wobei jede Bindung eine Phosphordiamidatbindung wie dargestellt in [Fig. 2B](#) ist, wobei  $X = \text{NR}_2$ , wobei R Wasserstoff oder Methyl ist,  $Y_1$  Sauerstoff ist und Z Sauerstoff ist.

7. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Verhältnis von ungeladenen Bindungen zu geladenen Bindungen in dem Oligomer zumindest 8:1 ist.

8. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Antisense-Oligomer eine Länge von 12 bis 25 Untereinheiten hat.

9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Bereich der Komplementarität mit der RNA-Zielsequenz eine Länge von 13 bis 20 Basen hat.

10. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Zielsequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 15, 16 und 21 bis 25.

11. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Zielsequenz komplementär ist zu einer 16S-rRNA-Konsensus-Sequenz Gram-positiver Bakterien oder einer 16S-rRNA-Konsensus-Sequenz

Gram-negativer Bakterien.

12. Verbindung nach Anspruch 11, wobei die Zielsequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 27 bis 30.

13. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Zielsequenz SEQ ID NO: 92 ist.

14. Verwendung eines im Wesentlichen ungeladenen Antisense-Oligomers, das 10 bis 40 Nucleotid-Untereinheiten enthält, wobei jede der Untereinheiten einen Morpholinring umfasst, der eine basenpaarbildende Einheit trägt, die wirksam ist, mittels Watson-Crick-Paarung an eine entsprechende Nucleotidbase zu binden, wobei das Antisense-Oligomer eine Nucleinsäurezielsequenz mit einer Länge von mindestens 10 Nucleotiden umfasst, die komplementär zu einer bakteriellen 16S- oder 23S-rRNA-Nucleinsäuresequenz ist, wobei angrenzende Untereinheiten durch ungeladene Bindungen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus ungeladenen Phosphoramidat- und Phosphordiamidatbindungen, oder durch geladene Phosphoramidatbindungen verbunden sind, wobei das Verhältnis von ungeladenen Bindungen zu geladenen Bindungen in dem Oligomer zumindest 4:1 ist, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer bakteriellen Infektion in einem menschlichen oder tierischen Sängereindividuum.

15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei das Oligomer in der Lage ist, bei einem  $T_m$ -Wert, der wesentlich größer ist als  $37^\circ\text{C}$ , mit der bakteriellen Sequenz zu hybridisieren.

16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei die ungeladenen Bindungen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus den Strukturen, wie dargestellt in [Fig. 2A](#) bis [Fig. 2D](#), wobei X Fluor, ein Alkyl oder substituiertes Alkyl, ein Alkoxy oder substituiertes Alkoxy, ein Thioalkoxy oder substituiertes Thioalkoxy oder ein unsubstituierter, monosubstituierter oder disubstituierter Stickstoff ist; Z Schwefel oder Sauerstoff ist;  $Y_1$  in [Fig. 2B](#) und [Fig. 2D](#) Schwefel, Stickstoff, Kohlenstoff oder Sauerstoff ist und  $Y_2$  in [Fig. 2C](#) Methylen, Schwefel oder Sauerstoff ist; und jedes Pi und Pj eine Purin- oder Pyrimidinbasenpaarbildende Einheit ist, die wirksam ist, mittels basenspezifischer Wasserstoffbindung an eine Base in einem Polynucleotid zu binden.

17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei jede ungeladene Bindung eine Phosphordiamidatbindung wie dargestellt in [Fig. 2B](#) ist, wobei  $X = \text{NR}_2$ , wobei R Wasserstoff oder Methyl ist,  $Y_1$  Sauerstoff ist und Z Sauerstoff ist.

18. Verwendung nach Anspruch 15, wobei jede Bindung eine Phosphordiamidatbindung wie dargestellt in [Fig. 2B](#) ist, wobei  $X = \text{NR}_2$ , wobei R Wasserstoff oder Methyl ist,  $Y_1$  Sauerstoff ist und Z Sauerstoff ist.

19. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 18, wobei das Antisense-Oligomer eine Länge von 12 bis 25 Basen hat.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 19, wobei der Bereich der Komplementarität mit der RNA-Zielsequenz eine Länge von 13 bis 20 Basen hat.

21. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 20, wobei die Zielsequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 15, 16 und 21 bis 25.

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 21, wobei die Zielsequenz komplementär zu einer 16S-rRNA-Konsensus-Sequenz Gram-positiver Bakterien oder einer 16S-rRNA-Konsensus-Sequenz Gram-negativer Bakterien ist.

23. Verwendung nach Anspruch 22, wobei die Zielsequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 27 bis 30.

24. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 21, wobei das Arzneimittel für die Behandlung einer Infektion verursacht durch E. coli, Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa, Vibrio cholera, Neisseria gonorrhoea, Helicobacter pylori, Bartonella henselae, Hemophilis Influenza, Shigella dysenterae, Staphylococcus aureus, Mycobacterium tuberculosis, Streptococcus pneumoniae, Treponema palladium and Chlamydia trachomatis ist, wobei das Antisense-Oligomer eine Sequenz hat, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 21 bis 25.

25. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 24, wobei das Antisense-Oligomer in einer Menge und auf eine Weise zu verabreichen ist, die zu einer Peak-Blutkonzentration von zumindest 200 bis 400 nM Antisense-Oligomer führt.

26. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 25, wobei das Arzneimittel für die Behandlung von bakteriellen Infektionen der Haut ist, wobei das Antisense-Oligomer über einem topischen Weg zu verabreichen ist.

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 25, wobei das Arzneimittel für die Behandlung einer bakteriellen Atemwegsinfektion ist, wobei das Antisense-Oligomer mittels Inhalation zu verabreichen ist.

28. Vieh- und Geflügelfutterzusammensetzung, umfassend ein Futtergetreide, das ergänzt ist mit einer subtherapeutischen Menge einer antibakteriellen Verbindung, wobei die Verbindung aus einem im Wesentlichen ungeladenen Antisense-Oligomer besteht, das 10 bis 40 Nucleotid-Untereinheiten enthält, wobei jede der Untereinheiten einen Morpholinring umfasst, der eine basenpaarbildende Einheit trägt, die wirksam ist, mittels Watson-Crick-Paarung an eine entsprechende Nucleotidbase zu binden, wobei das Antisense-Oligomer eine Nucleinsäure-Zielsequenz mit einer Länge von mindestens 10 Nucleotiden umfasst, die komplementär zu einer bakteriellen 16S- oder 23S-rRNA-Nucleinsäuresequenz ist, wobei angrenzende Untereinheiten durch ungeladene Bindungen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus ungeladenen Phosphoramidat- und Phosphordiamidatbindungen, oder durch geladene Phosphoramidatbindungen verbunden sind, wobei das Verhältnis von ungeladenen Bindungen zu geladenen Bindungen in dem Oligomer zumindest 4:1 ist.

29. Zusammensetzung nach Anspruch 28, wobei jede Bindung eine Phosphordiamidat-Bindung wie dargestellt in [Fig. 2B](#) ist, wobei  $X = NR_2$ , wobei R Wasserstoff oder Methyl ist,  $Y_1$  Sauerstoff ist und Z Sauerstoff ist.

30. Zusammensetzung nach Anspruch 28, wobei das Antisense-Oligomer eine Länge von 12 bis 25 Basen hat.

31. Zusammensetzung nach Anspruch 28, wobei der Bereich der Komplementarität mit der RNA-Zielsequenz eine Länge von 13 bis 20 Basen hat.

32. Zusammensetzung nach Anspruch 28, wobei die Zielsequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 15, 16, 21 bis 25 und 27 bis 30.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

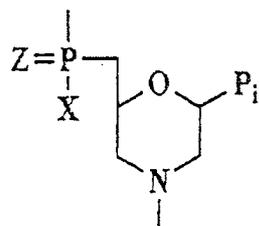


Fig. 1A

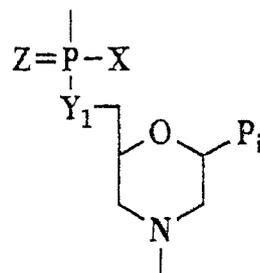


Fig. 1B

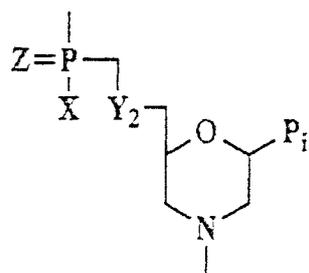


Fig. 1C

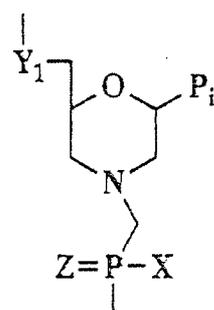
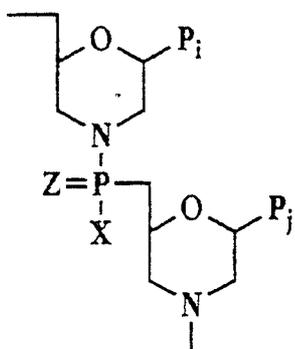
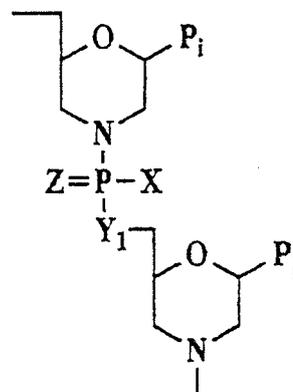


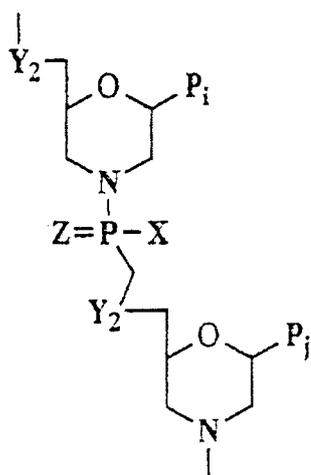
Fig. 1D



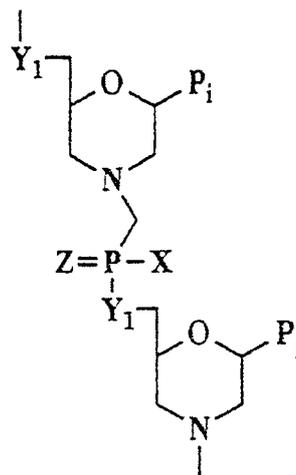
**Fig. 2A**



**Fig. 2B**



**Fig. 2C**



**Fig. 2D**

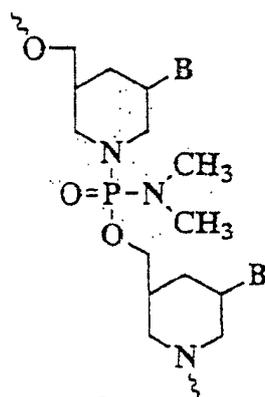
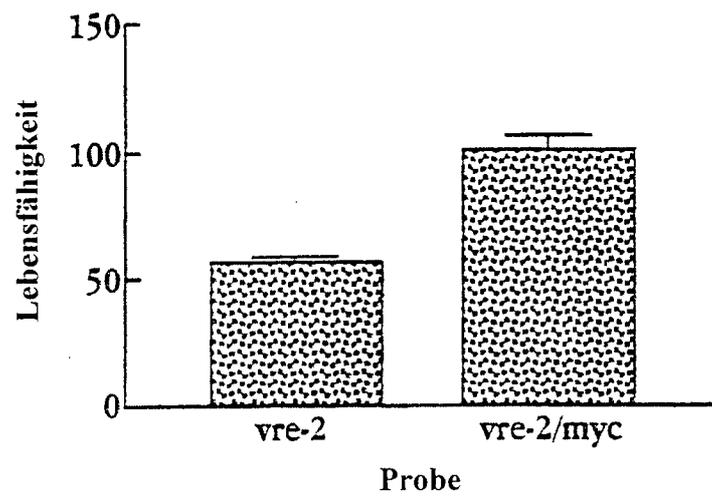
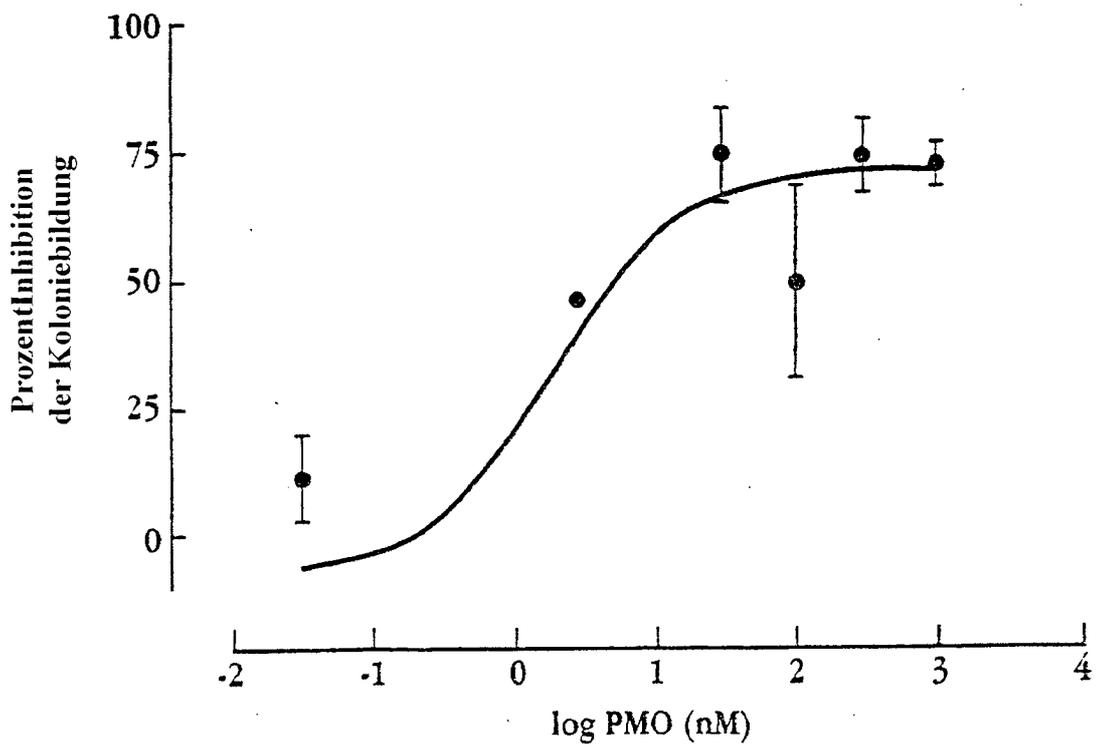


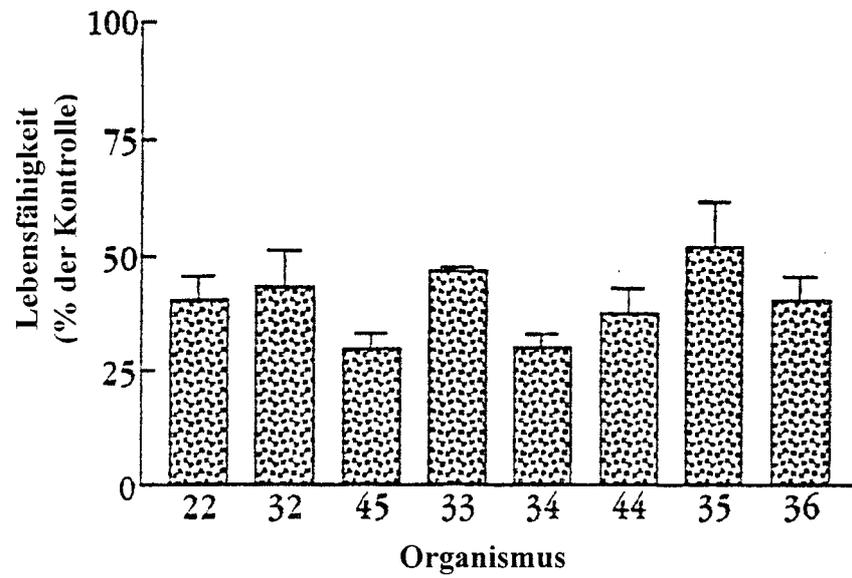
Fig. 3



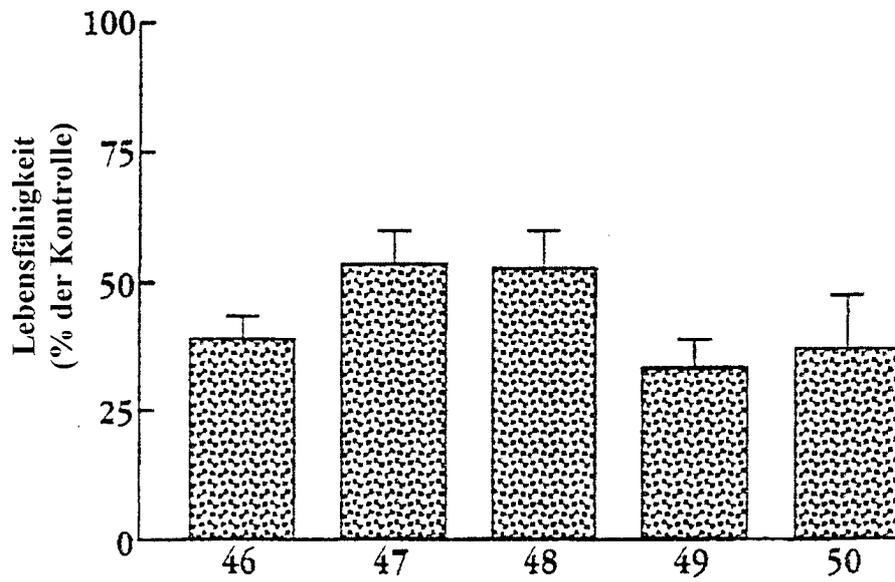
**Fig. 4**



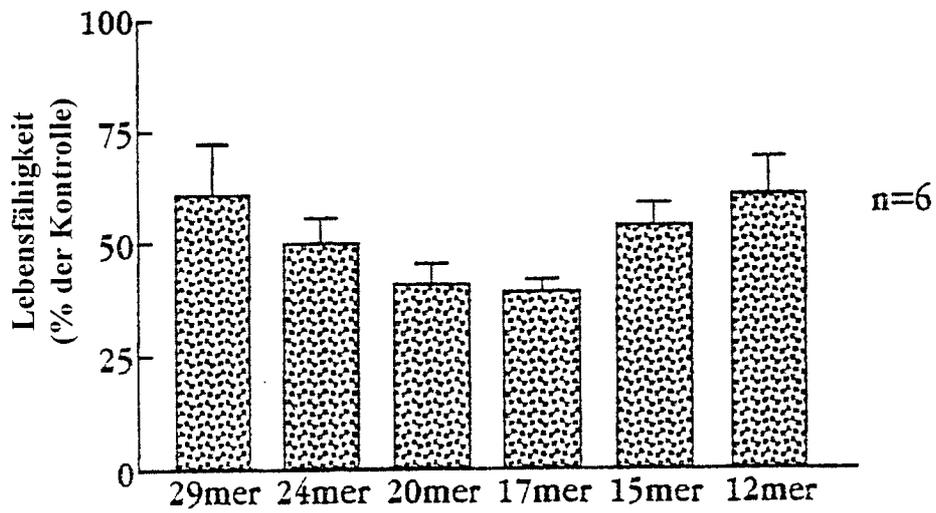
**Fig. 5**



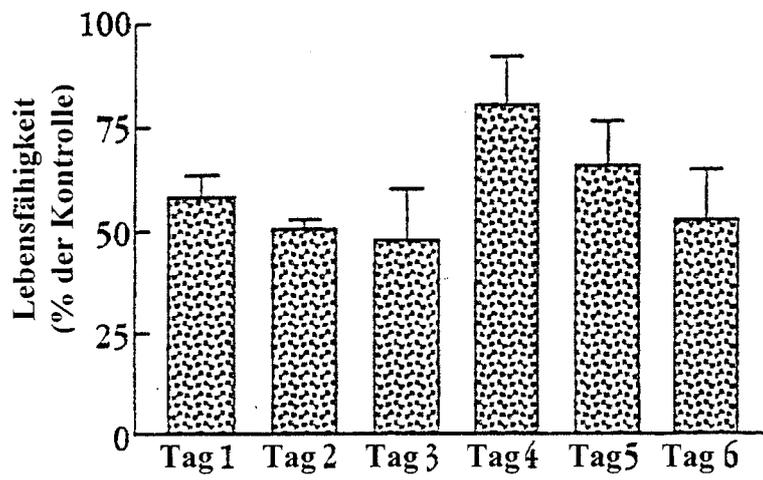
**Fig. 6**



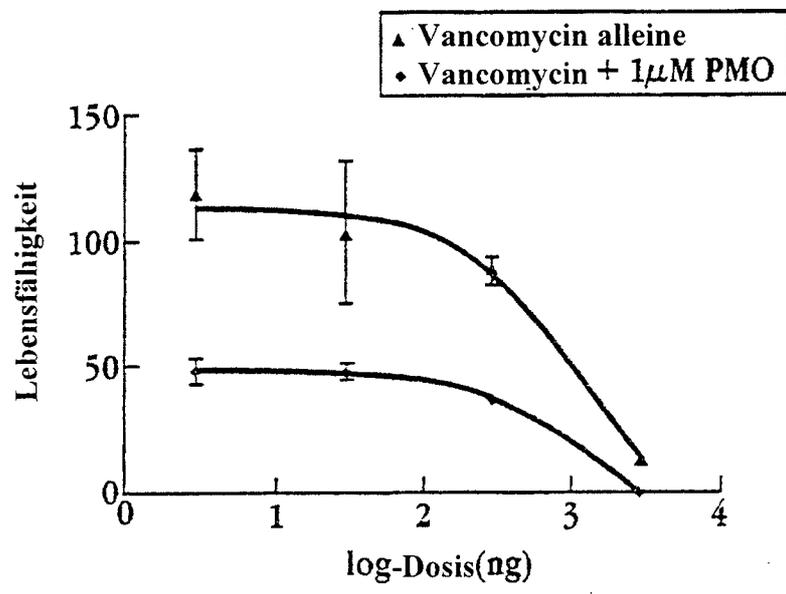
**Fig. 7**



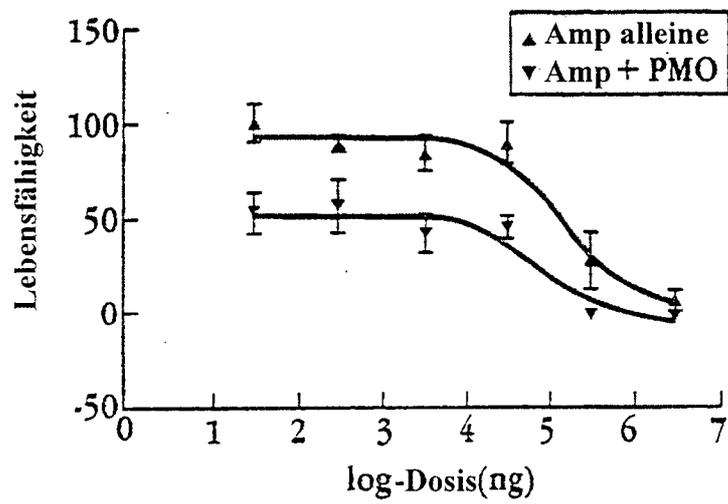
**Fig. 8**



**Fig. 9**



**Fig. 10A**



**Fig. 10B**