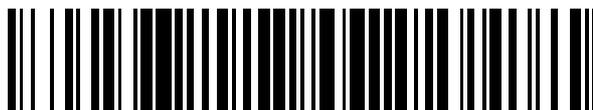


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 448 815**

51 Int. Cl.:

C07K 14/215 (2006.01)

C12Q 1/18 (2006.01)

G06F 17/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2002 E 02255442 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013 EP 1308457**

54 Título: **Estructura de los ribosomas e inhibidores de la síntesis de proteínas**

30 Prioridad:

03.08.2001 US 922251

08.02.2002 US 72634

14.01.2002 US 348731 P

09.08.2001 EP 01030682

25.01.2002 US 352024 P

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

17.03.2014

73 Titular/es:

YALE UNIVERSITY (50.0%)

451 College Street

New Haven, CT 06520, US y

MELINTA THERAPEUTICS, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

STEITZ, THOMAS A.;

MOORE, PETER B.;

BAN, NENAD;

NISSEN, POUL;

HANSEN, JEFFREY y

IPPOLITO, JOSEPH A.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 448 815 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Estructura de los ribosomas e inhibidores de la síntesis de proteínas

La presente invención se refiere en general al campo de la biosíntesis de proteínas y a moduladores, por ejemplo, inhibidores, de la biosíntesis de proteínas. Más particularmente, la invención se refiere a: métodos y composiciones para elucidar la estructura tridimensional de la unidad ribosómica grande, ya sea sola o en combinación con un inhibidor de la síntesis de proteínas; a la estructura tridimensional de la subunidad ribosómica grande, ya sea sola o en combinación con un inhibidor de la síntesis de proteínas; al uso de tales estructuras en el diseño y el ensayo de nuevos inhibidores de la síntesis de proteínas; y a los nuevos inhibidores de la síntesis de proteínas.

ANTECEDENTES

10 I. Ribosomas: estructura, función y composición

Los ribosomas son ribonucleoproteínas que están presentes en los procariotas y en los eucariotas. Comprenden alrededor de dos tercios de ARN y un tercio de proteína. Los ribosomas son los orgánulos celulares responsables de la síntesis de proteínas. Durante la expresión génica los ribosomas traducen la información genética codificada en un ARN mensajero a la proteína (Garrett et al. (2000) "The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics and Cellular Interactions", American Society for Microbiology, Washington, D.C.).

Los ribosomas comprenden dos subunidades de ribonucleoproteínas no equivalentes. La subunidad más grande (conocida también como la "subunidad ribosómica grande") es alrededor de dos veces más grande en tamaño que la subunidad más pequeña (también conocida como la "subunidad ribosómica pequeña"). La subunidad ribosómica pequeña se une al ARN mensajero (ARNm) y media en las interacciones entre el ARNm y los anticodones del ARN de transferencia (ARNt) de los cuales depende la fidelidad de la traducción. La subunidad ribosómica grande cataliza la formación de uniones peptídicas -la reacción de la peptidiltransferasa de la síntesis de proteínas- e incluye (al menos) dos diferentes sitios de unión del ARNt: el sitio A que aloja al aminoacil-ARNt entrante, que contribuirá su aminoácido a la cadena peptídica creciente, y el sitio P que aloja el complejo peptidil-ARNt, es decir, el ARNt unido a todos los aminoácidos que han sido agregados hasta ese momento a la cadena peptídica. La subunidad ribosómica grande también incluye uno o más sitios de unión para los factores de la proteína G que ayudan a las fases de iniciación, elongación y terminación de la síntesis de proteínas. Las subunidades ribosómicas grande y pequeña se comportan en forma independiente durante la fase de iniciación de la síntesis de proteínas; sin embargo, se ensamblan como ribosomas completos cuando está por comenzar la elongación.

El peso molecular del ribosoma procariótico es de aproximadamente $2,6 \times 10^6$ daltons. En los procariotas, la subunidad ribosómica pequeña contiene un ARN ribosómico (ARNr) 16S (unidades Svedberg) que tiene un peso molecular de aproximadamente $5,0 \times 10^5$ daltons. La subunidad ribosómica grande contiene un ARNr 23S que tiene un peso molecular de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ daltons y un ARNr 5S que tiene un peso molecular de aproximadamente $4,0 \times 10^5$ daltons. La subunidad pequeña procariótica contiene alrededor de 20 proteínas diferentes y su subunidad grande contiene alrededor de 35 proteínas. Las subunidades ribosómicas grande y pequeña juntas constituyen un ribosoma 70S en los procariotas.

Los ribosomas eucarióticos son en general más grandes que sus contrapartes procarióticas. En los eucariotas, las subunidades grandes y pequeñas juntas forman un ribosoma 80S. La subunidad pequeña de un ribosoma eucariótico incluye un solo ARNr 18S, mientras que la subunidad grande incluye un ARNr 5S, un ARNr 5.8S y un ARNr 28S. El ARNr 5.8S está relacionado estructuralmente con el extremo 5' del ARNr 23S procariótico, y el ARNr 28S está relacionado estructuralmente con el resto del ARNr 23S procariótico 3S (Moore (1998) Annu. Rev. Biophys. 27: 35-58). Las proteínas ribosómicas eucarióticas son cualitativamente similares a las proteínas ribosómicas procarióticas; sin embargo, las proteínas eucarióticas son más grandes y más numerosas (Moore (1998) *supra*).

II. Conservación estructural de la subunidad ribosómica grande

Si bien la composición química de las subunidades ribosómicas grandes varían de especie a especie, las secuencias de sus componentes proveen evidencia inequívoca de que son similares en estructura tridimensional, funcionan de una manera similar y están relacionadas evolutivamente. Las implicancias evolutivas de los datos de secuencias de ARNr disponibles se sintetizan en los artículos de Woese y otros en la parte II de "Ribosomal RNA. Structure, Evolution, Processing and Function in Protein Biosynthesis", (Zimmermann y Dahlberg, eds., CRC Press, Boca Ratón, FL, 1996). El artículo de Garret y Rodríguez-Fonseca en la parte IV del mismo volumen comenta el nivel inusualmente alto de la conservación de secuencias observado en la región de la peptidiltransferasa de la subunidad ribosómica grande. Los ribosomas de especies de archeas tales como *Haloarcula marismortu* se asemejan a los obtenidos de las especies eubacterianas tales como *E. coli* en tamaño y complejidad. Sin embargo, las proteínas en los ribosomas de *H. marismortui* está relacionadas más estrechamente con las proteínas ribosómicas halladas en los eucariotas (Wool et al. (1995) Biochem. Cell Biol. 73: 933-947).

55 III. Determinación de la estructura de los ribosomas

Mucho de lo que se conoce con respecto a la estructura de los ribosomas se deriva de los métodos físicos y

químicos que producen información de resolución relativamente baja. La microscopia electrónica (EM, por sus siglas en inglés) ha contribuido a una comprensión de la estructura de los ribosomas desde que se descubrió el ribosoma. En los años 70, la EM de baja resolución reveló la forma y la organización cuaternaria del ribosoma. A fines de los años 80, las posiciones de los epítopes superficiales de todas las proteínas en la subunidad pequeña de *E. coli*, así como también muchos en la subunidad grande habían sido mapeados usando técnicas de microscopia inmunoelectrónica (Oakes et al. (1986), Structure. Function and Genetics of Ribosomes, (Hardesty, B. y Kramer, G., eds.) Springer-Verlag, Nueva York, NY, pp. 47-67; Stoeffler et al. (1986), Structure, Function and Genetics of Ribosomes, (Hardesty, B. y Kramer, G., eds.) Springer-Verlag, Nueva York, NY, pp. 28-46). En los últimos años, los progresos realizados en la crio-EM de partículas simples y la reconstrucción de imágenes han llevado a las reconstrucciones tridimensionales del ribosoma de *E. coli* 70S y sus complejos con ARNts y factores de elongación a resoluciones de entre 15 Å y 25 Å (Stark et al. (1995) Structure 3: 815-821; Stark et al. (1997) Nature 389: 403-406; Agrawal et al. (1996) Science 271: 1000-1002; Stark et al. (1997) Cell 28: 19-28). Adicionalmente, las imágenes de EM tridimensionales del ribosoma han sido producidas a resoluciones suficientemente altas de modo que muchas de las proteínas y ácidos nucleicos que ayudan a la síntesis de proteínas pueden ser visualizadas unidas al ribosoma. Un modelo aproximado de la estructura de ARN en la subunidad grande ha sido construido para ajustarse a un mapa de microscopia electrónica de 7,5 Å de resolución de la subunidad 50S de *E. coli* y los datos bioquímicos disponibles (Mueller et al. (2000) J. Mol. Biol. 298: 35-59).

Si bien las imágenes provistas por la EM han sido útiles, se ha reconocido desde hace tiempo que una comprensión completa de la estructura de los ribosomas se derivaría sólo de la cristalografía de rayos X. En 1979, Yonath y Wittman obtuvieron los primeros cristales potencialmente útiles de ribosomas y subunidades ribosómicas (Yonath et al. (1980) Biochem. Internat. 1: 428-435). A mediados de los años 1980, los científicos prepararon cristales de ribosomas para la cristalografía de rayos X (Maskowski et al. (1987) J. Mol. Biol. 193: 818-822). Los primeros cristales de la subunidad ribosómica 50S de *H. marismortui* se obtuvieron en 1987. En 1991, se informaron mejoras en la resolución de los datos de difracción que se podían obtener de los cristales de la subunidad ribosómica 50S de *H. marismortui* (van Bohlen, K. (1991) J. Mol. Biol. 222: 11).

En 1995, se informaron mapas de densidad electrónica de baja resolución para las subunidades ribosómicas grandes y pequeñas de fuentes halófilas y termófilas (Schlunzen et al. (1995) Biochem. Cell Biol. 73: 739-749). Sin embargo, estos mapas de densidad electrónica de baja resolución demostraron ser falsos (Ban et al. (1998) Cell 93: 1105-1115).

El primer mapa de densidad electrónica del ribosoma que mostró características reconocibles como ARN doble fue un mapa cristalográfico de rayos X de 9 Å de resolución de la subunidad grande de *Haloarcula marismortui* (Ban et al. (1998) *supra*). La extensión del faseado de ese mapa a 5 Å de resolución hizo posible localizar varias secuencias de proteínas y ácidos nucleicos, cuyas estructuras habían sido determinadas independientemente (Ban et al. (1999) Nature 400: 841-847).

Aproximadamente al mismo tiempo, usando estrategias cristalográficas similares, se generó un mapa de 7,8 Å de resolución de todo el ribosoma de *Thermus thermophilus* mostrando las posiciones de las moléculas de ARNt unidas a sus sitios A, P, y E (sitio de salida de la proteína) (Cate et al. (1999) Science 285: 2095-2104), y se obtuvo un mapa de 5,5 Å de resolución de la subunidad 30S de *T. thermophilus* que permitió el ajuste de las estructuras de las proteínas disueltas y la interpretación de algunas de sus características de ARN (Clemons, Jr. et al. (1999) Nature 400: 833-840). Subsiguientemente, se publicó un mapa de 4,5 Å de resolución de la subunidad 30S de *T. thermophilus*, que se basó en parte en fases calculadas de un modelo correspondiente a 28% de la masa de la subunidad que había sido obtenido usando un mapa experimental de 6 Å de resolución (Tocij et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 14252-14257).

IV. Ubicación del sitio de la peptidiltransferasa en la subunidad ribosómica grande

Se conoce desde hace aproximadamente 35 años que la actividad de la peptidiltransferasa responsable de la formación de la unión peptídica que ocurre durante la síntesis de proteínas dirigida por el ARN mensajero es intrínseca a la subunidad ribosómica grande (Traut et al. (1964) J. Mol. Biol. 10: 63; Rychlik (1966) Biochim. Biophys. Acta 114: 425; Monro (1967) J. Mol. Biol. 26: 147-151; Maden et al. (1968) J. Mol. Biol. 35: 333-345) y se ha comprendido desde hace más tiempo que el ribosoma contiene proteínas así como también ARN. En algunas especies de bacterias, por ejemplo, la subunidad ribosómica grande contiene aproximadamente 35 proteínas diferentes y dos ARNs (Noller (1984) Ann. Rev. Biochem. 53: 119-162; Wittmann-Liebold et al. (1990) The Ribosome: Structure, Function, and Evolution, (W.E. Hill et al., eds.) American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1990), pp. 598-616). Estos hallazgos plantearon tres cuestiones relacionadas. ¿Cuál de los casi 40 componentes macromoleculares de la subunidad ribosómica grande contribuye a su sitio de peptidiltransferasa?, ¿dónde está ubicado ese sitio en la subunidad grande?, y ¿cómo actúa?

Hacia 1980, la lista de componentes que podría ser parte de la peptidiltransferasa del ribosoma había sido reducida a aproximadamente media docena de proteínas y ARNr 23S (ver Cooperman (1980) Ribosomes: Structure, Function and Genetics, (G. Chambliss et al., eds.) University Park Press, Baltimore, MD (1980), 531-554), y siguiendo el descubrimiento de ARNs catalíticos (Guerrier-Takada et al. (1983) Cell 35: 849-857; Kruger et al. (1982) Cell 31: 147-157), la hipótesis de que el ARNr 23S podría ser su único constituyente, lo que había sido propuesto años

antes, comenzó a preferirse. En 1984, Noller y colegas publicaron resultados de marcación de afinidad que mostraron que U2619 y U2620 (en *E. coli*: U2584, U2585) eran adyacentes al extremo CCA del ARNt unido al sitio P (Barta et al. (1984) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81: 3607-3611; Vester et al. (1988) EMBO J. 7: 3577-3587). Estos nucleótidos parecen ser parte de un bucle interno altamente conservado en el centro del dominio V del ARNr 23S.

5 La hipótesis de que este bucle está íntimamente involucrado en la actividad de la peptidiltransferasa fue sostenida por la observación de que mutaciones en ese bucle hacen que las células sean resistentes a muchos inhibidores de peptidiltransferasa, y la evidencia que lo implica en esta actividad ha seguido creciendo (ver, Noller (1991) Ann. Rev. Biochem. 60: 191-227; Garrett et al. (1996) Ribosomal ARN: Structure, Evolution, Processing and Function in Protein Biosynthesis, (R.A. Zimmerman y A.E. Dahlberg, eds.) CRC Press, Boca Ratón, FL (1996), pp. 327-355).

10 La prueba definitiva de que el bucle central en el dominio V es el único componente del ribosoma involucrado en la actividad peptidiltransferasa ha permanecido sin embargo esquiva. Los estudios han mostrado que era posible preparar partículas que retenían la actividad peptidiltransferasa mediante desproteinizaciones crecientemente vigorosas de las subunidades ribosómicas grandes, sin embargo, no fue posible producir partículas activas que fueran completamente libres de proteínas. No obstante, combinado con resultados de reconstitución anteriores

15 (Franceschi et al. (1990) J. Biol. Chem. 265: 6676-6682), este trabajo redujo el número de proteínas que podrían estar involucradas a sólo dos: L2 y L3 (ver, Green et al. (1997) Annu. Rev. Biochem. 66: 679-716). Más recientemente, Watanabe y colaboradores informaron éxitos al provocar la actividad peptidiltransferasa a partir de ARNr 23S libre de proteínas, sintetizado *in vitro* (Nitta et al. (1998) ARN 4: 257-267), sin embargo, sus observaciones parecen no haber resistido un escrutinio ulterior. Por lo tanto, la cuestión aún seguía siendo: ¿es el ribosoma una ribozima o no?

20 Durante los años siguientes, la ubicación del sitio de la peptidiltransferasa en el ribosoma ha sido estudiada casi exclusivamente por microscopía electrónica. A mediados de los años 80, comenzó a acumularse evidencia de que hay un túnel que corre a través de la subunidad ribosómica grande desde el centro de su lado de interfase de subunidad a su parte posterior (Milligan et al. (1986) Nature 319: 693-695; Yonath et al. (1987) Science 236: 813-816), y ha habido importantes motivos para creer que los polipéptidos pasan a través de éste a medida que son sintetizados (Bernabeu et al. (1982) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79: 3111-3115; Ryabova et al. (1988) FEBS Letters 226: 255-260; Beckmann et al. (1997) Science 278: 2123-2126). Investigaciones con crió-EM más recientes (Frank et al. (1995) Nature 376: 441-444; Frank et al. (1995) Biochem. Cell Biol. 73: 757-765; Stark et al. (1995) *supra*) confirmaron la existencia del túnel y demostraron que los extremos CCA de los ARNrs unidos al ribosoma unidos a

30 los sitios A y P se encuentran en el extremo de la interfase de la subunidad del túnel. En consecuencia, el sitio de la peptidiltransferasa tiene que estar ubicado en la misma posición, que es en la parte inferior de una hendidura profunda en el centro de la superficie de la interfase de subunidad de la subunidad grande, inmediatamente por debajo de su protuberancia central.

35 Los sustratos de la reacción catalizada en el sitio de la peptidiltransferasa de la subunidad grande son un aminoacil-ARNt (aa-ARNt) y un peptidil-ARNt. El primero se une en el sitio A del ribosoma y el último en su sitio P. El grupo α -amino del aa-ARNt ataca el carbono del carbonilo acilando el grupo 3' hidroxilo del peptidil-ARNt, y se forma un intermediario tetrahédrico en el carbono del carbonilo. El intermediario tetrahédrico resuelve dar un péptido extendido por un aminoácido esterificado al ARNt unido al sitio A y un ARNt desacilado en el sitio P.

40 Este esquema de reacción es sostenido por las observaciones de Yarus y colegas que sintetizaron un análogo del intermediario tetrahédrico uniendo un oligonucleótido que tiene la secuencia CCdA a puromicina a través de un grupo fosforamida (Welch et al. (1995) Biochemistry 34: 385-390). La secuencia CCA, que es la secuencia 3' terminal de todos los ARNts, se une a la subunidad grande por sí misma, consistente con los datos bioquímicos que muestran que las interacciones entre los ARNt y la subunidad grande dependen en gran parte de sus secuencias CCA (Moazed et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3725-3728). La puromicina es un análogo aa-ARNt que interactúa con el sitio A ribosómico, y el grupo fosforamida del compuesto simula el intermediario de carbono tetrahédrico. Este análogo del estado de transición, CCdA-fosfatopuromicina (CCdA-p-puro), se une estrechamente al ribosoma, e inhibe su actividad peptidiltransferasa (Welch et al. (1995) *supra*).

V. Determinación de la estructura de las macromoléculas usando cristalografía de rayos X

50 Para describir mejor los esfuerzos realizados para determinar la estructura de los ribosomas, se provee a continuación una síntesis general de la cristalografía de rayos X.

Cada átomo en un cristal dispersa los rayos X en todas las direcciones, pero la difracción cristalina se observa solamente cuando un cristal es orientado con relación al haz de rayos X de tal modo que la dispersión atómica interfiere constructivamente. Las orientaciones que llevan a la difracción pueden ser computadas si la longitud de onda de los rayos X usados y la simetría y dimensiones de la unidad de celda del cristal son conocidas (Blundell et al. (1976) Protein Crystallography (Molecular Biology Series), Academic Press, Londres). El resultado es que si se coloca un detector detrás de un cristal que está siendo irradiado con rayos X monocromáticos de una longitud de onda apropiada, el modelo de difracción registrado consistirá en puntos, cada punto representando una de las orientaciones que da lugar a la interferencia constructiva.

Cada punto en un modelo de este tipo, según como sea registrado, está caracterizado por (i) una intensidad (su

negru); (ii) una ubicación, que codifica la información acerca de la orientación de la difracción; y (iii) una fase. Si se conocen todas estas cosas con respecto a cada punto en un modelo de difracción de cristales, la distribución de electrones en la unidad de celda del cristal puede ser computada por la transformada de Fourier (Blundell *et al.* (1976) *supra*), y de esa distribución o mapa de densidad electrónica, se pueden determinar las posiciones atómicas.

5 Lamentablemente, la información de fases esencial para computar las distribuciones electrónicas no puede ser medida directamente de los modelos de difracción. Uno de los métodos usados rutinariamente para determinar las fases de macromoléculas, tales como las proteínas y los ácidos nucleicos, es denominado reemplazo isomorfo múltiple (MIR, por sus siglas en inglés) que involucra la introducción de nuevos dispersores de rayos X en la unidad de celda del cristal. Típicamente, estas adiciones son átomos pesados, que realizan una contribución significativa al
10 modelo de difracción. Es importante que las adiciones sean suficientemente bajas en número, de tal modo que sus posiciones puedan ser ubicadas y que dejen a la estructura de la molécula o de la celda cristalina inalterada, es decir, los cristales deberían ser isomorfos. El reemplazo isomorfo se realiza usualmente difundiéndose diferentes complejos de metales pesados en los canales de los cristales de proteínas preformados. Las macromoléculas exponen cadenas laterales (tales como grupos SH) en estos canales de solventes que son capaces de unir metales pesados. También es posible reemplazar metales livianos endógenos en metaloproteínas con otros más pesados, por ejemplo, zinc por mercurio, o calcio por samario. Alternativamente, el derivado isomorfo puede ser obtenido uniéndose en forma covalente un metal pesado a la macromolécula en solución y luego sometiénolo a condiciones de
15 cristalización.

Los átomos de metales pesados que se usan rutinariamente para el reemplazo isomorfo incluyen, pero no están limitados a mercurio, uranio, platino, oro, plomo y selenio. Ejemplos específicos incluyen cloruro de mercurio, fosfato de etil-mercurio y pentamina de osmio, pentamina de iridio. Como tales metales pesados contienen muchos más electrones que los átomos livianos (H, N, C, O, y S) de la proteína, los metales pesados dispersan los rayos x más fuertemente. Todos los haces difractados aumentarían por lo tanto en intensidad después de la substitución del metal pesado si la interferencia fuera positiva. De hecho, sin embargo, alguna interferencia es negativa; en consecuencia, luego de la substitución del metal pesado, algunos puntos aumentan en intensidad, otros disminuyen, y muchos no muestran una diferencia detectable.

Diferencias de fases entre puntos difractados pueden ser determinadas de los cambios de intensidad después de la substitución del metal pesado. Primero, las diferencias de intensidad se usan para deducir las posiciones de los átomos pesados en la unidad de celda del cristal. La sumatoria de Fourier de estas diferencias de intensidad da mapas de los vectores entre los átomos pesados, los así llamados mapas de Patterson. De estos mapas de vectores se deduce el ordenamiento atómico de los átomos pesados. De las posiciones de los metales pesados en la unidad de celda, se calculan las amplitudes y fases de su contribución a los haces difractados de los cristales de proteínas que contienen metales pesados.

Este conocimiento se usa luego para hallar la fase de la contribución de la proteína en ausencia de los átomos de metales pesados. Como se conoce la fase y la amplitud de los metales pesados y la amplitud de la proteína sola, así como también la amplitud de la proteína más los metales pesados (es decir, el complejo de proteína-metal pesado), se conocen una fase y tres amplitudes. De aquí se puede calcular la interferencia de los rayos X dispersados por los metales pesados y la proteína para determinar si la interferencia es constructiva o destructiva. La medida de la interferencia positiva o negativa, con conocimiento de la fase del metal pesado, da un estimado de la fase de la proteína. Como se determinan dos diferentes ángulos de fase y son soluciones igualmente buenas, se puede usar un segundo completo de metal pesado que también da dos ángulos de fase posibles. Sólo uno de estos tendrá el mismo valor que uno de los dos ángulos de fase previos; éste representa por lo tanto el ángulo de fase correcto. En la práctica, más de dos complejos de metal pesado diferentes se realizan usualmente para dar un estimado razonablemente bueno de la fase para todas las reflexiones. Cada estimado de fase individual contiene errores experimentales que surgen de los errores en las amplitudes medidas. Además, para muchas reflexiones las diferencias de intensidad son demasiado pequeñas para ser medidas después de un reemplazo isomorfo particular, y se pueden probar otras.

Las amplitudes y las fases de los datos de difracción de los cristales de proteínas se usan para calcular un mapa de densidad electrónica de la unidad de repetición del cristal. Este mapa es interpretado luego para alojar los residuos de la molécula de interés. Esa interpretación se hace más compleja por varias limitaciones en los datos. Primero, el mapa propiamente dicho contiene errores, principalmente debido a errores en los ángulos de fase. Además, la calidad del mapa depende de la resolución de los datos de difracción, los que a su vez dependen de cuán bien ordenados están los cristales. Esto influye directamente sobre la calidad del mapa que puede ser producido. La resolución se mide en unidades angstrom (Å); cuanto más pequeño es este número, mayor es la resolución y, por lo tanto, mayor es la cantidad de detalles que se pueden ver.

La construcción del modelo inicial es un proceso de prueba y error. Primero, se tiene que decidir cómo la cadena de polipéptidos o ácidos nucleicos hace su camino a través del mapa de densidad electrónica. El rastro de cadena resultante constituye una hipótesis por la cual se trata de hacer coincidir la densidad de las cadenas laterales con la secuencia conocida del polipéptido o el ácido nucleico. Cuando se ha obtenido finalmente un rastro de cadena razonable, se construye un modelo inicial que ajusta los átomos de la molécula en la densidad electrónica. Los gráficos de ordenador se usan tanto para el rastreo de la cadena como para la construcción del modelo para

presentar los datos y manipular los modelos.

5 El modelo inicial contendrá algunos errores. Si los cristales difractan a una resolución suficientemente alta (por ejemplo, mejor que 3,5 Å), la mayoría o sustancialmente todos los errores pueden ser removidos por refinamiento cristalográfico del modelo usando algoritmos de ordenador. En este proceso, el modelo es cambiado para minimizar la diferencia entre las amplitudes de difracción observadas experimentalmente y aquellas calculadas para un cristal hipotético que contiene el modelo (en lugar de la molécula real). Esta diferencia es expresada como un factor R (sin concordancia residual) que es 0,0 para la concordancia exacta y aproximadamente 0,59 para la falta de concordancia total.

10 En general, el factor R para una estructura macromolecular bien determinada se encuentra preferentemente entre 0,15 y 0,35 (tal como menos de aproximadamente 0,24-0,28). La diferencia residual es una consecuencia de errores e imperfecciones en los datos. Estos se derivan de varias fuentes, incluyendo leves variaciones en la conformación de las moléculas de proteínas, así como también correcciones inexactas para la presencia de solvente y para diferencias en la orientación de los microcristales a partir de los cuales se construye el cristal. Esto significa que el modelo final representa un promedio de moléculas que son levemente diferentes en conformación y en orientación.

15 En estructuras refinadas a alta resolución, no hay usualmente errores importantes en la orientación de residuos individuales, y los errores estimados en las posiciones atómicas son usualmente de aproximadamente 0,1-0,2 Å, siempre que se conozca la secuencia de la proteína o del ácido nucleico. Las uniones hidrógeno, tanto dentro de la molécula de interés como para unir ligandos, pueden ser identificadas con un alto grado de confianza.

20 Típicamente, las estructuras de rayos X pueden ser determinadas siempre que la resolución sea mejor que 3,5 Å. Los mapas de densidad electrónica son interpretados colocando las secuencias de aminoácidos y/o ácidos nucleicos conocidas en regiones de densidad electrónica.

VI. La necesidad de mayor resolución para la subunidad ribosómica 50S

25 Aunque el arte provee cristales de la subunidad ribosómica 50S, y mapas cristalográficos de rayos X de 9 Å y 5 Å de resolución de la estructura del ribosoma 50S, los cristales y los datos de difracción de rayos X del arte previo no son suficientes para establecer las estructuras tridimensionales de las 31 proteínas y los 3.043 nucleótidos de la subunidad ribosómica 50S. Así, los cristales y los mapas del arte previo son inadecuados para el diseño en base a la estructura de los agentes activos, tales como herbicidas, fármacos, insecticidas y venenos animales.

30 Son necesarios mapas cristalográficos de rayos X de mayor resolución, más detallados, para determinar la ubicación y la estructura tridimensional de las proteínas y nucleótidos en ribosomas y subunidades ribosómicas, particularmente para la subunidad ribosómica 50S. Una estructura molecular exacta de la subunidad ribosómica 50S no sólo hará posible la investigación ulterior y la comprensión del mecanismo de la síntesis de proteínas, sino también el desarrollo de agentes terapéuticos y fármacos efectivos que modulan (por ejemplo, inducen o inhiben) la síntesis de proteínas.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

35 La presente invención se basa, en parte, en la determinación de una estructura atómica de alta resolución de una subunidad ribosómica, más particularmente, una subunidad grande de un ribosoma. Además, la invención se basa, en parte, en la determinación de estructuras atómicas de alta resolución de algunos inhibidores de la síntesis de proteínas, a saber, antibióticos, cuando estos interactúan con la subunidad grande del ribosoma.

40 La invención provee la estructura de la subunidad grande de un ribosoma aislado del organismo *Haloarcula marismortui*. Sin embargo, en vista del alto nivel de homología de secuencias y estructural entre los ribosomas de organismos en diferentes reinos, la información estructural divulgada en la presente se puede usar para producir, usando técnicas de rutina, modelos estructurales de alta resolución de unidades ribosómicas grandes para cualquier organismo de interés.

45 Aunque hay homología significativa entre ribosomas de diferentes organismos, por ejemplo, entre ribosomas de seres humanos y algunos patógenos humanos, hay aún diferencias que pueden ser explotadas terapéuticamente. Por ejemplo, muchos inhibidores de la síntesis de proteínas clínicamente y comercialmente significativos, por ejemplo, antibióticos tales como estreptomina, tetraciclina, cloranfenicol y eritromicina, tienen como objetivo selectivamente los ribosomas bacterianos e interrumpen la síntesis de proteínas bacterianas, pero al mismo tiempo no están dirigidos o afectan de otro modo significativamente a la función ribosómica humana. Como resultado, a lo largo de los años, los antibióticos han probado ser valiosos en el tratamiento de las infecciones microbianas en los seres humanos. Sin embargo, existe aún una necesidad de contar con nuevos inhibidores de la síntesis de proteínas, particularmente debido al desarrollo de cepas de patógenos que son resistentes a los antibióticos conocidos. La información provista en la presente brinda una idea del diseño de nuevos inhibidores de la síntesis de proteínas.

55 La invención usa sistemas de computación que contienen coordenadas atómicas que definen por lo menos una porción de la estructura tridimensional de un ribosoma, más específicamente, una subunidad ribosómica grande. La

invención provee métodos para usar las coordenadas atómicas para identificar nuevas moléculas que pueden unir selectivamente ribosomas, y que actúan preferentemente como inhibidores selectivos de la síntesis de proteínas. Además, la invención usa sistemas de computación que contienen coordenadas atómicas que definen por lo menos una porción de algunos antibióticos cuando interactúan con sus sitios de unión en la subunidad ribosómica grande.

5 Además, la invención provee métodos para usar las coordenadas atómicas de los antibióticos para identificar nuevas moléculas que unen selectivamente a los ribosomas, y que actúan preferentemente como inhibidores selectivos de la síntesis de proteínas. Cada uno de estos aspectos de la invención se comenta con mayores detalles a continuación.

10 La invención puede usar un sistema de computación que comprende: (a) una memoria que tiene almacenada en la misma datos indicativos de coordenadas atómicas derivados de un mapa de densidad electrónica que tiene una resolución de al menos aproximadamente 4,5 Å, más preferentemente de al menos aproximadamente 3,0 Å, y más preferentemente aun de aproximadamente 2,4 Å y que define un locus ribofuncional de una subunidad grande de un ribosoma; y (b) un procesador en comunicación eléctrica con la memoria, comprendiendo el procesador un programa para generar un modelo tridimensional representativo del locus ribofuncional.

15 El sistema de computación puede comprender además un dispositivo, por ejemplo, un monitor de ordenador, o una terminal para proveer una representación visual del modelo molecular. El procesador puede comprender además uno o más programas para facilitar el diseño racional del fármaco.

20 El sistema de computación puede comprender además por lo menos una porción de las coordenadas atómicas depositadas en el Banco de Datos de Proteínas bajo el número de acceso PDB ID: 1FFK (subunidad ribosómica grande), 1FFZ (subunidad ribosómica grande complejizada con CCdA-p-puro), 1FG0 (subunidad ribosómica grande complejizada con un análogo mini-hélice de aminoacil-ARNr), 1JJ2 (estructura ribosómica grande), 1K73 (subunidad ribosómica grande complejizada con anisomicina), 1KC8 (subunidad ribosómica grande complejizada con blastidina), 1K8A (subunidad ribosómica grande complejizada con carbomicina), 1KD1 (subunidad ribosómica grande complejizada con espiramicina); o 1 K9M (subunidad ribosómica grande complejizada con tilosina) o grabada en un disco compacto, Disco N.º 1 de 1.

25 Las coordenadas atómicas definen además al menos una porción de un inhibidor de la síntesis de proteínas, por ejemplo, un antibiótico, más específicamente un antibiótico seleccionado del grupo que consiste en anisomicina, blastidina, carbomicina A, esparsomicina, espiramicina, tilosina, virginiamicina M, azitromicina, linezólido, cloranfenicol y eritromicina, complejizado con un locus ribofuncional. Más específicamente, la invención provee coordenadas atómicas de la subunidad ribosómica grande junto con las coordenadas atómicas de antibióticos que interactúan con la subunidad ribosómica grande. Estas coordenadas atómicas son grabadas en un disco compacto, Disco N.º 1, y corresponden a: subunidad ribosómica grande complejizada con anisomicina (nombre de archivo: anisomycin.pdb o ANISOMYC.PDB); subunidad ribosómica grande complejizada con blastidina (nombre de archivo: blastidicin.pdb o BLASTICI.PDB); subunidad ribosómica grande complejizada con carbomicina (nombre de archivo: carbomycin.pdb o CARBOMYC.PDB); subunidad ribosómica grande complejizada con tilosina (nombre de archivo: tylosin.pdb o TYLOSIN.PDB); subunidad ribosómica grande complejizada con esparsomicina (nombre de archivo: sparsomycin.pdb o SPARSOMY.PDB); subunidad ribosómica grande complejizada con virginiamicina M (nombre de archivo: virginiamycin.pdb o VIRGINIA.PDB); subunidad ribosómica grande complejizada con espiramicina (nombre de archivo: spiramycin.pdb o SPIRAMYC.PDB); subunidad ribosómica grande complejizada con azitromicina (nombre de archivo: AZITHROM.PDB o azithromycin.pdb); o subunidad ribosómica grande complejizada con linezólido (nombre de archivo: LINEZOLI.PDB o linezolid.pdb); o subunidad ribosómica grande complejizada con eritromicina (nombre de archivo: erythromycin.pdb).

30 En una realización preferida, el locus ribofuncional comprende al menos una porción de un sitio activo en la subunidad ribosómica, por ejemplo, al menos una porción de uno o más de: un sitio de peptidiltransferasa (una porción del cual puede ser definida por una pluralidad de residuos presentados en la Tabla 5A o 5B); un sitio A (una porción del cual puede ser definida por una pluralidad de residuos presentados en la Tabla 6A o 6B); un sitio P (una porción del cual puede ser definida por una pluralidad de residuos presentados en la Tabla 7A o 7B); un túnel de salida de polipéptidos (una porción del cual puede ser definida por una pluralidad de residuos presentados en la Tabla 8A u 8B, Tabla 9 o Tabla 10); o un dominio que une un antibiótico (una porción del cual puede ser definida por una pluralidad de residuos presentados en la Tabla 11A o 11B, Tabla 12A o 12B, Tabla 13A o 13B, Tabla 14A o 14B, Tabla 15A o 15B, Tabla 16A o 16B, Tabla 17A o 17B, Tabla 18A o 18B, Tabla 19A o 19B, o Tabla 20A o 20B). Debe considerarse que una pluralidad de residuos incluye al menos 3 residuos, preferentemente al menos 5 residuos, y más preferentemente al menos 10 residuos. El locus ribofuncional puede ser definido por átomos de ARN ribosómico, una o más proteínas ribosómicas, o una combinación de ARN ribosómico y una o más proteínas ribosómicas.

35 En otra realización preferida, las coordenadas atómicas son producidas por modelado molecular. Usando las coordenadas atómicas provistas en la presente, el experto en el arte puede generar modelos de cualquier ribosoma de interés usando técnicas convencionales, por ejemplo, modelado de homología convencional, y o técnicas de reemplazo molecular. En otra realización, las coordenadas atómicas son producidas por modelado de homología usando al menos una porción de las coordenadas atómicas depositadas en el Banco de Datos de Proteínas bajo el número de acceso PDB ID: 1FFK, 1FFZ, 1FG0, 1JJ2, 1K73, 1KC8, 1K8A, 1KD1 o 1K9M, o cualquiera de las

coordenadas atómicas incluidas en el disco compacto, Disco N.º 1. En otra realización, las coordenadas atómicas son producidas por reemplazo molecular usando al menos una porción de las coordenadas atómicas depositadas en el Banco de Datos de Proteínas bajo el número de acceso PDB ID: 1FFK, 1FFZ, 1FG0, 1JJ2, 1K73, 1KC8, 1K8A, 1KD1 o 1K9M, o cualquiera de las coordenadas atómicas grabadas en el disco compacto, Disco N.º 1.

- 5 En una realización preferida, las coordenadas atómicas definen residuos que son conservados entre ribosomas o subunidades ribosómicas de patógenos, por ejemplo, organismos procarióticos, y, opcionalmente, pero más preferentemente, también están ausentes en ribosomas o subunidades ribosómicas de un organismo huésped, por ejemplo, un ser humano. En otra realización preferida, las coordenadas atómicas pueden definir residuos que son conservados entre ribosomas o subunidades ribosómicas de organismos procarióticos, por ejemplo, bacterias, y, opcionalmente, pero más preferentemente, también están ausentes en subunidades ribosómicas de eucariotas, por ejemplo, un mamífero, más preferentemente, un ser humano. Esta información se puede usar, por ejemplo, a través del uso de uno o más modelos moleculares, para identificar objetivos para el diseño racional de fármacos que puede ser explotado para desarrollar nuevas moléculas, por ejemplo, inhibidores de la síntesis de proteínas, que interrumpen la síntesis de proteínas en un patógeno, por ejemplo, una bacteria, pero no interrumpen o afectan sustancialmente de otra manera la síntesis de proteínas en un organismo huésped, por ejemplo, un ser humano.

En otro aspecto, la invención provee una variedad de métodos para diseñar, testear y refinar nuevas moléculas por medio del diseño racional de fármacos. Por ejemplo, la invención provee un método que comprende los pasos de: (a) proveer un modelo, por ejemplo, un modelo molecular, que tiene un locus ribofuncional de una subunidad grande de un ribosoma, en donde el modelo es definido por el ordenamiento espacial de átomos derivados de un mapa de densidad electrónica que tiene una resolución de al menos aproximadamente 4,5 Å, más preferentemente de al menos aproximadamente 3,0 Å, y más preferentemente aun de aproximadamente 2,4 Å; y (b) usando el modelo para identificar una molécula candidato que tiene una superficie complementaria al locus ribofuncional. Preferentemente, la molécula candidato se ajusta estereoquímicamente, y más preferentemente se une, con el locus ribofuncional de la subunidad grande del ribosoma.

- 25 En una realización preferida, el método comprende uno o más pasos adicionales de: producir la molécula candidato identificada en un método como éste; determinar si la molécula candidato, cuando se produce, modula (por ejemplo, induce o reduce) la actividad ribosómica; identificando una molécula modificada; producir la molécula modificada; determinar si la molécula modificada, cuando se produce, modula la actividad ribosómica; y producir la molécula modificada para ser usada o bien sola o en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La molécula candidato y/o la molécula modificada puede ser un antibiótico o un análogo de antibiótico, por ejemplo, un antibiótico macrólido o un análogo macrólido.

En una realización preferida, el locus ribofuncional usado en un método como éste comprende al menos una porción de un sitio activo en la subunidad ribosómica. En otra realización preferida, el locus ribofuncional es definido por al menos una porción de uno o más de: un sitio de peptidiltransferasa (una porción del cual puede ser definido por una pluralidad de residuos presentados en la Tabla 5A o Tabla 5B); un sitio A (una porción del cual puede ser definido por una pluralidad de residuos presentados en la Tabla 6A o Tabla 6B); un sitio P (una porción del cual puede ser definida por una pluralidad de residuos presentados en la Tabla 7A o Tabla 7B); un túnel de salida del polipéptido (una porción del cual puede ser definida por una pluralidad de residuos presentados en la Tabla 8A, Tabla 8B, Tabla 9, Tabla 10); o un dominio que une un antibiótico (una porción del cual puede ser definida por una pluralidad de residuos presentados en la Tabla 11A, Tabla 11B, Tabla 12A, Tabla 12B, Tabla 13A, Tabla 13B, Tabla 14A, Tabla 14B, Tabla 15A, Tabla 15B, Tabla 16A, Tabla 16B, Tabla 17A, Tabla 17B, Tabla 18A, Tabla 18B, Tabla 19A, Tabla 19B, Tabla 20A o Tabla 20B). El locus ribofuncional puede ser definido por átomos de ARN ribosómico, una o más proteínas ribosómicas, o una combinación de ARN ribosómico y una o más proteínas ribosómicas.

En otra realización preferida, las coordenadas atómicas se usan para producir un modelo molecular en una forma electrónica. Las coordenadas atómicas preferentemente son producidas por modelado molecular. En otra realización, las coordenadas atómicas son producidas por modelado de homología usando al menos una porción de las coordenadas atómicas depositada en el Banco de Datos de Proteínas bajo el número de acceso PDB ID: 1FFK, 1FFZ, 1FG0, 1JJ2, 1K73, 1KC8, 1K8A, 1KD o 1 K9M, o las coordenadas atómicas grabadas en un disco compacto, Disco N.º 1. En otra realización, las coordenadas atómicas son producidas por reemplazo molecular usando al menos una porción de las coordenadas atómicas depositada en el Banco de Datos de Proteínas bajo el número de acceso PDB ID: 1FFK, 1FFZ, 1FG0, 1JJ2, 1K73, 1KC8, 1K8A, 1KD1 o 1K9M o cualquiera de las coordenadas atómicas incluidas en el disco compacto, Disco N.º 1.

En una realización preferida, las coordenadas atómicas pueden definir residuos que son conservados entre los ribosomas o las subunidades ribosómicas de los patógenos, por ejemplo, organismos procarióticos, y, opcionalmente, pero más preferentemente, también están ausentes en ribosomas o subunidades ribosómicas de un organismo huésped, por ejemplo, un ser humano. En otra realización preferida, las coordenadas atómicas pueden definir residuos que están conservados entre ribosomas o subunidades ribosómicas de organismos procarióticos, por ejemplo, bacterias, y, opcionalmente pero más preferentemente, también están ausentes de ribosomas o subunidades ribosómicas de eucariotas, por ejemplo, un mamífero, más preferentemente un ser humano. Esta información se puede usar, por ejemplo, mediante el uso de uno o más modelos moleculares, para identificar objetivos para el diseño racional de fármacos que puede ser explotado para desarrollar nuevas moléculas, por

ejemplo, inhibidores de la síntesis de proteínas, que interrumpen la síntesis de proteínas en un patógeno, por ejemplo, una bacteria, pero no interrumpen o afectan de otro modo sustancialmente la síntesis de proteínas en un organismo huésped, por ejemplo, un ser humano.

5 En una realización preferida, las coordenadas atómicas definen además al menos una porción de un inhibidor de la síntesis de proteínas, por ejemplo, un antibiótico, más específicamente un antibiótico seleccionado entre el grupo que consiste en anisomicina, blastidina, carbomicina A, esparsomicina, espiramicina, tilosina, virginiamicina M, azitromicina, linezólido y eritromicina, complejizada con un locus ribofuncional. En una realización preferida, el locus ribofuncional comprende al menos una porción de un sitio activo de un ribosoma, por ejemplo, al menos una porción de uno o más de (i) un sitio de peptidiltransferasa, (ii) un sitio A, (iii) un sitio P, (iv) un túnel de salida de polipéptidos.

10 Más específicamente, la invención provee coordenadas atómicas de antibióticos que interactúan con la subunidad ribosómica grande. Estas coordenadas atómicas son grabadas en un disco compacto, Disco N.º 1, y corresponden a: la subunidad ribosómica grande complejizada con anisomicina (nombre de archivo: anisomycin.pdb o ANISOMYC.PDB); la subunidad ribosómica grande complejizada con blastidina (nombre de archivo: blastidin.pdb o BLASTICI.PDB); la subunidad ribosómica grande complejizada con carbomicina A (nombre de archivo: carbomycin.pdb o CARBOMYC.PDB); la subunidad ribosómica grande complejizada con tilosina (nombre de archivo: tylosin.pdb o TYLOSIN.PDB); la subunidad ribosómica grande complejizada con esparsomicina (nombre de archivo: sparsomycin.pdb o SPARSOMY.PDB); la subunidad ribosómica grande complejizada con virginiamicina M (nombre de archivo: virginiamycin.pdb o VIRGINIA.PDB); la subunidad ribosómica grande complejizada con espiramicina (nombre de archivo: spiramycin.pdb o SPIRAMYC.PDB); la subunidad ribosómica grande complejizada con azitromicina (nombre de archivo: AZITHROM.PDB o azithromycin.pdb); o la subunidad ribosómica grande complejizada con linezólido (nombre de archivo: LINEZOLI.PDB o linezolid.pdb); o la subunidad ribosómica grande complejizada con eritromicina (nombre de archivo: erythromycin.pdb).

25 En otro aspecto, la invención provee un método para identificar un candidato principal para un nuevo inhibidor de la síntesis de proteínas. El método comprende los pasos de (a) proveer un modelo molecular de al menos una porción de un inhibidor de la síntesis de proteínas cuando el inhibidor de la síntesis de proteínas se encuentra interactuando con un locus ribofuncional de una subunidad grande de un ribosoma; y (b) usar el modelo para identificar el candidato principal. En una realización preferida, el candidato principal es capaz de interactuar, y con mayor preferencia aún, unir un locus ribofuncional.

30 En otra realización preferida, el método comprende el paso adicional de producir el compuesto principal. Después de la síntesis, el compuesto principal puede ser testeado con respecto a la actividad biológica, por ejemplo, modulación de la actividad ribosómica en un ensayo *in vitro* o inhibición del crecimiento de microorganismos de interés. En base a los resultados de tales estudios, es posible determinar las relaciones de estructura-actividad, que pueden ser usadas luego para diseñar otras modificaciones del compuesto principal para mejorar una característica particular de interés. Los compuestos principales modificados pueden ser producidos y evaluados luego con respecto a la actividad biológica, como antes. Una vez que un compuesto de interés ha sido diseñado, sintetizado y testeado con respecto a la actividad, puede ser producido luego en cantidades comercialmente factibles para usar como un producto farmacéutico.

40 En una realización preferida, la molécula de partida (es decir, el inhibidor de la síntesis de proteínas), el compuesto principal y el compuesto penúltimo es un antibiótico o un análogo de antibiótico. En otra realización, el compuesto principal y también el compuesto penúltimo es un antibiótico híbrido (es decir, comprende una porción de un primer antibiótico y una porción de un segundo antibiótico diferente).

45 En otra realización preferida, el modelo usado en la práctica de la invención es un modelo de un antibiótico seleccionado entre el grupo que consiste en anisomicina, blastidina, carbomicina A, esparsomicina, espiramicina, tilosina, virginiamicina M, azitromicina, linezólido, o eritromicina. El modelo comprende preferentemente una porción de las coordenadas atómicas grabada en el disco compacto, Disco N.º 1 de 1 bajo el nombre de archivo: anisomycin.pdb, blastidin.pdb, carbomycin.pdb, sparsomycin.pdb, spiramycin.pdb, tylosin.pdb, virginiamycin.pdb, ANISOMYC.PDB, BLASTICI.PDB, CARBOMYC.PDB, SPARSOMY.PDB, SPIRAMYC.PDB, TYLOSIN.PDB, VIRGINIA.PDB, AZITHROM.PDB, LINEZOLI.PDB, azithromycin.pdb, linezolid.pdb, o erythromycin.pdb. En otra realización preferida, el penúltimo compuesto es un análogo de un antibiótico seleccionado del grupo que consiste en anisomicina, blastidina, carbomicina A, esparsomicina, espiramicina, tilosina, virginiamicina M, azitromicina, linezólido o eritromicina.

55 En una realización preferida, el locus ribofuncional comprende al menos una porción de un sitio activo de un ribosoma, por ejemplo, al menos una porción de uno o más de (i) un sitio de peptidiltransferasa, (ii) un sitio A, (iii) un sitio P, y (iv) un túnel de salida de polipéptidos. En otra realización, el modelo molecular útil en la práctica de la invención es una forma electrónica, en cuyo caso el modelo molecular es generado preferentemente por modelado molecular.

En otro aspecto, la invención provee nuevos inhibidores de la síntesis de proteínas que interrumpen la función de un ribosoma objetivo. Estos inhibidores pueden ser diseñados y testeados rápidamente como se divulga en la presente.

Un tipo de inhibidor de la síntesis de proteínas de la invención comprende: un primer dominio de unión que tiene una superficie, por ejemplo, una superficie accesible a un solvente, que imita o duplica una superficie de una primera molécula conocida, por ejemplo, un primer antibiótico, que se une con un primer sitio de contacto, por ejemplo, un primer locus ribofuncional, en o sobre una subunidad ribosómica grande; y un segundo dominio de unión que tiene una superficie, por ejemplo, una superficie accesible a un solvente, que imita o duplica una superficie de una segunda molécula conocida, por ejemplo, un segundo antibiótico, que se une con un segundo sitio de contacto, por ejemplo, un segundo locus ribofuncional, en o sobre la subunidad ribosómica. El primer dominio está unido al segundo dominio de tal modo de permitir que el primer dominio y el segundo dominio se unan simultáneamente con sus respectivos sitios de contacto en o sobre la subunidad ribosómica de modo de interrumpir la síntesis de proteínas en una subunidad ribosómica. En una realización preferida, el inhibidor de la síntesis de proteínas tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 1.500 y una IC₅₀ de menos de aproximadamente 50 µM, más preferentemente menos de aproximadamente 10 µM.

Otro tipo de inhibidor de la síntesis de proteínas es una molécula sintética, creada por ingeniería genética, que comprende: (i) un dominio de unión que tiene una superficie, por ejemplo, una superficie accesible a un solvente, que imita o duplica una superficie accesible a un solvente de una molécula conocida, por ejemplo, un primer antibiótico conocido, que se une con un sitio de contacto, por ejemplo, un locus ribofuncional en o sobre una subunidad ribosómica; y (ii) un nuevo dominio efector unido al dominio de unión, el que, después de la unión del dominio de unión con el sitio de contacto, ocupa un espacio dentro o adyacente a la subunidad ribosómica, interrumpiendo de este modo la síntesis de proteínas en la subunidad ribosómica. En una realización preferida, el inhibidor de la síntesis de proteínas tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 1.500 y una IC₅₀ de menos de aproximadamente 50 µM, más preferentemente menos de aproximadamente 10 µM.

El método de la invención puede proveer nuevos inhibidores de la síntesis de proteínas, por ejemplo, una molécula capaz de contactar al menos tres residuos, pero menos de trece residuos de contacto en la Tabla 11A que juntos definen un bolsillo de unión de anisomicina de una subunidad ribosómica grande, una molécula capaz de contactar al menos tres residuos, pero menos de diez residuos de contacto en la Tabla 12A, que juntos definen un bolsillo de unión de blasticidina de una subunidad ribosómica grande, una molécula capaz de contactar al menos tres residuos, pero menos de dieciséis residuos de contacto en la Tabla 13A que juntos definen un bolsillo de unión de carbomicina A de una subunidad ribosómica grande, una molécula capaz de contactar al menos tres residuos, pero menos de veinte residuos de contacto en la Tabla 14A que juntos definen un bolsillo de unión de tilosina de una subunidad ribosómica grande, una molécula capaz de contactar al menos tres residuos, pero menos de nueve residuos de contacto en la Tabla 15A que juntos definen un bolsillo de unión de esparsomicina de una subunidad ribosómica grande, una molécula capaz de contactar al menos tres residuos, pero menos de trece residuos de contacto en la Tabla 16A que juntos definen un bolsillo de unión de virginiamicina M de una subunidad ribosómica grande, una molécula capaz de contactar al menos tres residuos, pero menos de quince residuos de contacto en la Tabla 17A que juntos definen un bolsillo de unión de espiramicina de una subunidad ribosómica grande, una molécula capaz de contactar al menos tres residuos, pero menos de trece residuos de contacto en la Tabla 18A que juntos definen un bolsillo de unión de eritromicina de una subunidad ribosómica grande, una molécula capaz de contactar al menos tres pero menos de once residuos de contacto en la Tabla 19A que juntos definen un bolsillo de unión de azitromicina de una subunidad ribosómica grande, o una molécula capaz de contactar al menos tres residuos pero menos de quince residuos de contacto en la Tabla 20A que juntos definen un bolsillo de unión de linezóolido de una subunidad ribosómica grande. Los residuos de contacto son aquellos residuos en la subunidad ribosómica grande que se encuentran en contacto de van der Waals con el antibiótico de interés.

En otro aspecto, el método provee un inhibidor de la síntesis de proteínas que comprende, por ejemplo, una molécula capaz de contactar una pluralidad de residuos en la Tabla 11A que juntos definen un bolsillo de unión de anisomicina de una subunidad ribosómica grande, pero que no tienen uno o más átomos presentes en la molécula de anisomicina, cuyas coordenadas atómicas están grabadas en el Disco N.º 1 bajo el nombre de archivo ANISOMYC.PDB; una molécula capaz de contactar una pluralidad de residuos en la Tabla 12A que juntos definen un bolsillo de unión de blasticidina de una subunidad ribosómica grande, pero que no tienen uno o más átomos presentes en la molécula de blasticidina, cuyas coordenadas atómicas están grabadas en el Disco N.º 1 bajo el nombre de archivo BLASTICI.PDB; una molécula capaz de contactar una pluralidad de residuos en la Tabla 13A que juntos definen un bolsillo de unión de carbomicina A de una subunidad ribosómica grande, pero que no tienen uno o más átomos presentes en la carbomicina A, cuyas coordenadas atómicas están grabadas en el Disco N.º 1 bajo el nombre de archivo CARBOMYC.PDB; una molécula capaz de contactar una pluralidad de residuos en la Tabla 14A que juntos definen un bolsillo de unión de tilosina de una subunidad ribosómica grande, pero que no tienen uno o más átomos presentes en tilosina, cuyas coordenadas atómicas están grabadas en el Disco N.º 1 bajo el nombre de archivo TYLOSIN.PDB; una molécula capaz de contactar una pluralidad de residuos en la Tabla 15A que juntos definen un bolsillo de unión de esparsomicina de una subunidad ribosómica grande, pero que no tienen uno o más átomos presentes en la esparsomicina, cuyas coordenadas atómicas están grabadas en el Disco N.º 1 bajo el nombre de archivo SPARSOMY.PDB; una molécula capaz de contactar una pluralidad de residuos en la Tabla 16A que juntos definen un bolsillo de unión de virginiamicina M de una subunidad ribosómica grande, pero que no tienen uno o más átomos presentes en la virginiamicina M, cuyas coordenadas atómicas están grabadas en el Disco N.º 1 bajo el nombre de archivo VIRGINIA.PDB; una molécula capaz de contactar una pluralidad de residuos en la Tabla 17A que juntos definen un bolsillo de unión de espiramicina de una subunidad ribosómica grande, pero que no

tienen uno o más átomos presentes en la espiramicina, cuyas coordenadas atómicas están grabadas en el Disco N.º 1 bajo el nombre de archivo SPIRAMYC.PDB; una molécula capaz de contactar una pluralidad de residuos en la Tabla 18A que juntos definen un bolsillo de unión de eritromicina de una subunidad ribosómica grande, pero que no tienen uno o más átomos presentes en la eritromicina, cuyas coordenadas atómicas están grabadas en el Disco N.º 1 bajo el nombre de archivo erythromycin.pdb; una molécula capaz de contactar una pluralidad de residuos en la Tabla 19A que juntos definen un bolsillo de unión de azitromicina de una subunidad ribosómica grande, pero que no tienen uno o más átomos presentes en la azitromicina, cuyas coordenadas atómicas están grabadas en el Disco N.º 1 bajo el nombre de archivo azithromycin.pdb; o una molécula capaz de contactar una pluralidad de residuos en la Tabla 20A que juntos definen un bolsillo de unión de linezólido de una subunidad ribosómica grande, pero que no tienen uno o más átomos presentes en el linezólido, cuyas coordenadas atómicas están grabadas en el Disco N.º 1 bajo el nombre de archivo linezolid.pdb.

Los aspectos que anteceden y las realizaciones de la invención se pueden comprender mejor por referencia a las siguientes figuras, a la descripción detallada y a las reivindicaciones. Otras ventajas resultan evidentes de los dibujos.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El archivo de la patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. Copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) en color serán provistas por la Oficina a pedido y tras el pago del arancel necesario.

Presentaciones en color similares a algunas de las siguientes figuras pueden hallarse, por ejemplo, en Ban et al. (2000) Science 289: 905-920; o Nissen et al. (2000) Science 289: 920-930.

Las Figuras en color también se presentan en escalas de grises con el mismo número de figura seguido por un apóstrofe.

Los objetos y características de la invención se podrán comprender mejor por referencia a los dibujos descriptos a continuación:

25 Las Figuras 1(A)-(E) muestran la densidad electrónica de un mapa de densidad electrónica de 2,4 Å de resolución. Específicamente, la Figura 1(A) muestra una vista en estereó de una unión entre los dominios II, III y IV de ARNr 23S. La Figura 1(B) muestra la región extendida de la proteína L2 que interactúa con el ARN que la rodea. La Figura 1(C) muestra en detalle la región L2 con un ion Mg^{2+} unido. La Figura 1(D) muestra en detalle L2 con cadenas laterales de aminoácidos. La Figura 1(E) muestra hélices 94-97 del dominio 6.

30 La Figura 2 muestra la subunidad ribosómica grande de *H. marismortui* en la vista en corona. La subunidad se muestra en la vista en corona, con su tallo L7/L12 a la derecha, su tallo L1 a la izquierda, y su protuberancia central (CP) arriba. En esta vista, la superficie de la subunidad que interactúa con la subunidad ribosómica pequeña enfrenta al lector. El ARN se muestra en gris en una presentación que llena el espacio. Los esqueletos de las proteínas visibles se muestran en dorado. Un análogo del estado de transición unido al sitio de la peptidiltransferasa de la subunidad está indicado en verde. La partícula es de aproximadamente 250 Å a través.

35 Las Figuras 3(A)-(B) muestran la estructura secundaria del ARNr 23S de *H. marismortui*. La estructura secundaria de este ARNr 23S se muestra en un formato estandarizado. La Figura 3(A) muestra la mitad 5' de la subunidad grande de ARNr. La Figura 3(B) muestra la mitad 3' de la subunidad grande de ARNr. Este diagrama muestra todos los apareamientos de bases vistos en la estructura de cristal de la subunidad grande que son estabilizados por al menos dos enlaces de hidrógeno. Los apareamientos mostrados en rojo fueron predichos y se observan. Los mostrados en verde fueron predichos, pero no se observan. Las interacciones mostradas en azul se observan, pero no fueron predichas. Las bases mostradas en negro no parecen estar involucradas en interacciones de apareamiento. Las secuencias que no pueden ser visualizadas en el mapa de densidad electrónica de 2,4 Å de resolución se ilustran en gris con las estructuras secundarias predichas para ellas.

40 Las Figuras 4(A)-(L) muestran las estructuras terciarias de los dominios de ARN en la subunidad ribosómica grande de *H. marismortui*, su ARN como un todo, y esquemas de sus ARNs. Específicamente, las Figuras 4(A) y 4(B) muestran la estructura de ARN de toda la subunidad. Los dominios están codificados por color como se muestra en el esquema de la Figura 5(C). La Figura 4(A) muestra la partícula en la vista en corona. La Figura 4(B) muestra la imagen en la Figura 4(A) girada 180° alrededor de un eje que corre verticalmente en el plano de la imagen. Las Figuras 4(C) y 4(D) muestran un diagrama esquemático de la estructura secundaria de ARNr 23S y la estructura secundaria de ARNr 5S. La Figura 4(C) muestra un diagrama esquemático de la estructura secundaria de ARNr 23S de la Figura 3 con hélices numeradas de acuerdo con Leffers et al. ((1987) J. Mol. Biol. 195: 43-61), y los dominios de la molécula se indican por tonalidades de color. La Figura 4(D) muestra la estructura secundaria de ARNr 5S de *H. marismortui*. Líneas gruesas que unen bases representan el apareamiento de Watson-Crick. Las bases unidas por un casillero inferior "o" indican apareamiento no de Watson-Crick. Las bases unidas por líneas delgadas interactúan a través de un solo enlace de hidrógeno. Las bases mostradas en negro no están apareadas. Las bases mostradas en rojo son apareamientos predichos filogenéticamente que ahora han sido confirmados (Symanski et al. (1998) Nucl. Acids Res. 26: 156-159). Los pares mostrados en azul se observan, pero no fueron predichos, y los pares mostrados en

verde fueron predichos pero no se observan. Las Figuras 4(E) a 4(L) muestran vistas estereó de los dominios ARN en el ARNr 23S y/o ARNr 5S. Cada dominio tiene un código de color desde su extremo 5' a su extremo 3' para facilitar al observador siguiendo su trayectoria en tres dimensiones. Las superficies en donde ocurren las interacciones inter-dominios más importantes se muestran en mono a la derecha de las vistas estereó. La Figura 4(E) muestra el dominio I; la Figura 4(F) muestra el dominio II; la Figura 4(G) muestra el dominio III; la Figura 4(H) muestra el dominio IV; la Figura 4(I) muestra el dominio V, vista en corona; la Figura 4(J) muestra el dominio V, vista posterior; la Figura 4(K) muestra el dominio VI; y la Figura 4(L) muestra el ARNr 5S.

Las Figuras 5(A)-(C) muestran conservaciones y expansiones en el ARNr 23S de *H. marismortui*. La generalidad del ARN en estas imágenes es gris. Las secuencias que se halló que estaban >95% conservadas en los tres reinos filogenéticos se muestran en rojo. Las secuencias en donde la expansión en la estructura básica 23S está permitida se muestran en verde (Gutell *et al.* (2000) *supra*). Específicamente, la Figura 5(A) muestra la partícula rotada con respecto a la vista en corona de modo que se puede ver la hendidura de su sitio activo. La Figura 5(B) muestra la vista en corona. La Figura 5(C) muestra la vista posterior de la partícula, es decir, la vista en corona rotada 180° alrededor de su eje vertical.

Las Figuras 6(A)-(I) muestran estructuras de algunas proteínas ribosómicas de subunidad grande que tienen extensiones no globulares. Sólo se muestran los esqueletos de las proteínas. Los dominios globulares de estas proteínas se muestran en verde y sus extensiones no globulares se ilustran en rojo. Las posiciones de los iones de zinc en L44e y L37e también se indican. La Figura 6(A) muestra L2; la Figura 6(B) muestra L3; la Figura 6(C) muestra L39; la Figura 6(D) muestra L4; la Figura 6(E) muestra L15; la Figura 6(F) muestra L21e; la Figura 6(G) muestra L44e; la Figura 6(H) muestra L37e; la Figura 6(I) muestra L19;

Las Figuras 7(A)-(C) muestran proteínas que aparecen en la superficie de la subunidad ribosómica grande. El ARN de la subunidad se muestra en gris, como en la Figura 2, y los esqueletos de las proteínas se muestran en dorado. Específicamente, la Figura 7(A) muestra la subunidad en la vista en corona de la subunidad. La Figura 7(B) muestra el lado posterior de la subunidad en la orientación de la vista en corona. La Figura 7(C) muestra la vista inferior; el extremo del túnel de péptidos aparece en el centro de esta imagen. Las proteínas visibles en cada imagen son identificadas en las imágenes pequeñas en la esquina izquierda inferior de la Figura.

Las Figuras 8(A)-(F) muestran la distribución de las proteínas y las interacciones proteína-ARN en la subunidad ribosómica grande. Específicamente, la Figura 8(A) muestra las estructuras de las proteínas en la cercanía del extremo del túnel de péptidos y cómo se relacionan con las secuencias de ARN con las cuales interactúan. La proteína L22 se extiende una larga extensión de horquilla β dentro del ARNr 23S. L24 tiene una extensión similar pero la proteína entera está en la superficie de la partícula. L39 es la única proteína en la subunidad que no tiene estructura terciaria, mientras que L37e tiene ambas extensiones terminales NH_2 y COOH . L19 es única porque tiene dos dominios globulares en la superficie de la subunidad conectados por una secuencia extendida que se extiende a través del ARN. El extremo de L39 (verde) entra realmente en el túnel, mientras que L37e (roja) está completamente rodeada por el ARN. La Figura 8(B) muestra las extensiones no globulares de L2 y L3 que llegan a través de la masa de ARNr 23S hacia el sitio de la peptidiltransferasa, que está marcado por una molécula de CCdA-p-puromicina. La Figura 8(C) muestra L22 interactuando con porciones de seis de los dominios de ARNr 23S. La Figura 8(D) muestra un esquema de ARNr 23S que muestra las ubicaciones de las secuencias que hacen por lo menos un contacto de van der Waals con la proteína (roja). La Figura 8(E) muestra una vista en estereó de las proteínas de la subunidad ribosómica grande en la que se quitó todo el ARN. Las proteínas son de color rojo como una ayuda a la visualización solamente. La Figura 8(F) muestra una sección transversal de la subunidad en el área de la salida del túnel. La proteína L22 se muestra como moños en rojo, y el bucle de la horquilla β en donde mutaciones confieren resistencia a la eritromicina se muestra en anaranjado. Los átomos en la superficie se muestran en gris, los átomos de proteína se muestran en verde, y los átomos en la interfase del corte se muestran en azul.

Las Figuras 9(A)-(C) muestran estructuras químicas de los sustratos y análogos de la peptidiltransferasa del ribosoma. Específicamente, la Figura 9(A) muestra el intermediario de carbono tetrahédrico producido durante la formación de la unión peptídica; el carbono tetrahédrico está indicado por una flecha. La Figura 9(B) muestra el análogo del estado de transición formado por acoplamiento del 3' OH de CCdA al grupo amino del residuo O-metil tirosina de la puromicina vía un grupo fosfato, CCdA-p-puro (Welch *et al.* (1995) *supra*). La Figura 9(C) muestra una mini-hélice amino-N-acilada construida para ser direccionada al sitio A. La secuencia de oligonucleótidos 5' fosfato CCGCGGGCUGGUUCAAAACCGGCCCGCCGGACC 3' (SEQ ID NO: 1) puromicina debería formar 12 pares de bases. El constructo se basó en una mini-hélice que es un sustrato adecuado para la amino-acilación por la Tyr-ARNt sintetasa. El 3' OH de su C terminal está acoplado al 5' OH de la parte N6-dimetil A de la puromicina por una unión fosfodiéster.

Las Figuras 10(A)-(C) muestran mapas de densidad electrónica faseadas experimentalmente de los complejos de análogos del sustrato a una resolución de 3,2 Å, con modelos superpuestos (oxígeno, rojo; fósforo, púrpura; nitrógeno, azul; y carbono, verde para ARNr y amarillo para el sustrato). Específicamente, la Figura 10(A) muestra un mapa de densidad electrónica de diferencia Fo(complejo)-Fo(original) con un modelo de esqueleto de CCdA-p-puro superpuesto. La Figura 10(B) muestra un mapa de densidad electrónica 2Fo(complejo)-Fo(original) del CCdA-p-puro en la región del sitio activo con las estructuras del ribosoma y el inhibidor superpuestas mostrando la

proximidad del N3 de A2486 (2451) al oxígeno del fosfato, no formando puente en este complejo. La Figura 10(C) muestra un mapa de densidad electrónica con diferencias $F_o(\text{complejo}) - F_o(\text{original})$ del análogo troncal del aceptor de ARNt con un modelo de esqueleto de CCpuro superpuesto. Sólo hay densidad para la ribosa y el fosfato de C74 y ninguna para el resto de la horquilla de ARN.

5 Las Figuras 11(A) y (B) muestran un modelo combinado de la porción de CCA de la mini-hélice unida al sitio A y CCdAp-puro unida a los sitios A y P, con código de color como en la Figura 2. Específicamente, la Figura 11(A) muestra las interacciones de apareamiento de bases entre el sitio P C74 y C75 y el bucle P del ARNr 23S a la izquierda y el sitio A C75 con el bucle A del ARNr 23S a la derecha. El A2486 catalítico está cerca del oxígeno del fosfato (P) que es el análogo del oxianión del intermediario tetrahédrico. La Figura 11(B) muestra A2637 (en azul) que se encuentra entre los dos CCA's y A2486 (verde) cuyo N3 se aproxima a un oxígeno de fosfato que no forma puente. Los átomos de N1 de las bases A76 de los ARNts de los sitios A y P realizan interacciones casi idénticas con una ribosa 2' OH en ambos bucles, A y P, respectivamente, y un eje de alrededor de 2 veces relaciona estos residuos.

15 La Figura 12 muestra un modelo de llenado de espacios del ARNr 23S y 5S, las proteínas y el inhibidor de CCdA-p-puro vistos hacia abajo de la hendidura del sitio activo en una "vista en corona" rotada. Las bases son blancas y los esqueletos del fosfato de azúcar son amarillos. El inhibidor se muestra en rojo y las proteínas numeradas se muestran en azul. Las proteínas L1 y L11 posicionadas a resolución más baja están en el esqueleto en azul. La protuberancia central está marcada CP.

20 La Figura 13(A) muestra un diagrama de vista en estéreo de la distribución tridimensional de los residuos que comprende los bucles A y P y el bucle de la peptidiltransferasa. La Figura 13(B) muestra una vista en estéreo del bucle central en el dominio V desde la dirección del túnel. Los residuos están codificados por color en base a las mutaciones que confieren la resistencia al antibiótico. La Figura 13(C) muestra el sitio activo del dominio V con su bucle central mostrado como la estructura secundaria.

25 Las Figuras 14(A) y (B) muestran el acercamiento más próximo de los polipéptidos al sitio activo de la peptidiltransferasa marcado por una representación de bolas y palos del inhibidor de Yarus, CCdA-p-puro. Específicamente, la Figura 14(A) muestra una representación en espiral del esqueleto de ARN del dominio V en rojo y bases en gris y una representación del esqueleto en bandas de las trece proteínas que interactúan con éste. La Figura 14(B) muestra una vista cercana del sitio activo en el que se retiró el ARN. El fosfato del análogo de Yarus y las proteínas cuyas extensiones están más cerca del inhibidor se muestran en bandas con sus cadenas laterales más cercas en una representación del átomo. Las distancias en Å entre los átomos de proteínas más cercanos y el análogo de fósforo del carbón tetrahédrico (rosa) se muestran, como también un péptido modelado (rosa).

30 La Figura 15 muestra nucleótidos conservados en la región de la peptidiltransferasa que une la representación del llenado de espacios CCdA-p-puro A de la región del sitio activo con el inhibidor de Yarus visto hacia abajo de la hendidura del sitio activo. Todos los átomos que pertenecen a los nucleótidos del ARNr 23S que están 95% conservados en los tres reinos (Gutell *et al.* (2000) *supra*) están coloreados en rojo y todos los otros nucleótidos en blanco; el inhibidor está coloreado en azul.

35 Las Figuras 16(A)-(C) muestran el aparato catalítico del sitio activo de la peptidiltransferasa. Específicamente, la Figura 16(A) muestra una vista en estéreo de una porción del mapa de densidad electrónica de 2,4 Å de resolución experimental (Ban *et al.* (2000) *Science* 289: 905-920) de la subunidad grande en la región del sitio catalítico en estéreo. La estructura del ARN involucrada en interacciones con A2486 está superpuesta. Los residuos G2102 (2061) y G2482 (2447) están unidos por hidrógeno al N6 de A2486 (2451) y G2482 que interactúa con un grupo fosfato vecino. La Figura 16(B) muestra una representación del esqueleto con enlaces hidrógeno con líneas de rayas que muestran G2482, G2102, A2486 y el fosfato incorporado que se propone para dar por resultado un reenvío de carga a través de G2482 al N3 de A2486. La Figura 16(C) muestra las formas tautoméricas normal e imina más rara de G2482 y A2486 que se proponen para estabilizar por el fosfato de residuo 2485 incorporado.

40 Las Figuras 17(A)-(C) muestran el mecanismo propuesto de síntesis de péptidos catalizado por el ribosoma. Específicamente, la Figura 17(A) muestra el N3 de A2486 sustrayendo un protón del grupo NH_2 ya que este último ataque el carbono del carbonilo del peptidil-ARNr. La Figura 17(B) muestra un N3 protonado que estabiliza el intermediario de carbono tetrahédrico por enlace de hidrógeno al oxianión. La Figura 17(C) muestra el protón transferido del N3 al 3' OH del peptidil ARNr a medida que el péptido recién formado se desacila.

45 Las Figuras 18(A) y (B) muestran representaciones de llenado de espacio de la subunidad ribosómica 50S con las 3 moléculas de ARNt, en la misma orientación relativa en que se encuentran en la estructura de ribosoma 70S por Noller y colegas acoplados a la unión CCA en el sitio A y el sitio P. Específicamente, la Figura 18(A), mostrada en el lado izquierdo, muestra toda la subunidad en vista en corona rotada con el ARNr en amarillo, las proteínas en rosa y los ARNts en anaranjado. La Figura 18(B), mostrada en el lado derecho, muestra una vista en primer plano mostrando las proteínas numeradas en rosa y el ARNr en azul. Una representación de la cinta del esqueleto de los sitios A, P y E se muestra en amarillo, rojo y blanco, respectivamente.

Las Figuras 19(A)-(F) muestran el túnel de salida del polipéptido. Específicamente, la Figura 19(A) muestra la

subunidad cortada por el medio, bisectando aproximadamente su protuberancia central y su túnel de péptidos a lo largo de toda su longitud. Las dos mitades han sido abiertas como páginas de un libro. Todos los átomos del ribosoma se muestran en una representación CPK, con todos los átomos de ARN que no están en contacto con el solvente mostrados en blanco y todos los átomos de proteínas que no están en contacto con solvente mostradas en verde. Los átomos de superficie de las proteínas y el ARN están codificados con colores con el carbono en amarillo, el oxígeno en rojo, y el nitrógeno en azul. Una trayectoria posible para un polipéptido que pasa a través del túnel se muestra como una cinta blanca. También se muestra el sitio de la peptidiltransferasa (PT). La Figura 19(B) muestra un detalle del túnel de salida de polipéptidos con la distribución de grupos polares y no polares, con átomos coloreados como en la Figura 19(A), la constricción en el túnel formado por las proteínas L22 y L4 (manchas verdes cerca de la PT), y la salida relativamente amplia del túnel. Un polipéptido modelado se muestra en blanco. La Figura 19(C) muestra la superficie del túnel con átomos del esqueleto del ARN codificados por color por dominio: dominio I (blanco), II (azul claro), III (dorado), IV (verde), V (anaranjado), 5S (rosa) y las proteínas están en azul. Se muestra el centro de la peptidiltransferasa (PTC). La Figura 19 (D) es una representación de llenado de espacios de la superficie de la subunidad grande a la salida del túnel mostrando el ordenamiento de las proteínas, algunas de las cuales pueden tener un rol en la secreción de proteínas. El ARN está en blanco (bases) y amarillo (esqueleto) y las proteínas numeradas están en azul. Un polipéptido modelado sale del túnel en rojo. La Figura 19(E) muestra una vista en primer plano de la mitad del túnel de salida que muestra la relación entre el centro de la peptidiltransferasa (PTC) y las proteínas L4 (amarillo) y L22 (azul). El inhibidor de Yarus y un péptido modelado están en púrpura y el ARNr 23S está en rojo y blanco. La Figura 19(F) muestra un esquema de la estructura secundaria del ARNr 23S que identifica las secuencias que contactan el túnel en rojo.

La Figura 20 es una representación ilustrativa que muestra la relación espacial entre el antibiótico anisomicina unido a una subunidad ribosómica grande.

La Figura 21 es una representación ilustrativa que muestra la relación espacial entre el antibiótico blasticidina unido a una subunidad ribosómica grande.

La Figura 22 es una representación ilustrativa que muestra la relación espacial entre los antibióticos carbomicina y tilosina unidos a una subunidad ribosómica grande.

La Figura 23 es una representación ilustrativa que muestra la relación espacial entre el antibiótico esparsomicina unido a una subunidad ribosómica grande.

La Figura 24 es una representación ilustrativa que muestra la relación espacial entre los antibióticos virginiamicina M (estreptogramina A) y carbomicina A unidos a una subunidad ribosómica grande.

La Figura 25 es una representación ilustrativa que muestra la relación espacial entre el antibiótico espiramicina unido a una subunidad ribosómica grande.

La Figura 26 es una representación ilustrativa que muestra la relación espacial entre el antibiótico azitromicina unido a una subunidad ribosómica grande.

La Figura 27 es una representación ilustrativa que muestra la relación espacial entre el antibiótico linezólido unido a una subunidad ribosómica grande.

La Figura 28 es una representación ilustrativa que muestra la relación espacial entre el antibiótico eritromicina unido a una subunidad ribosómica grande.

La Figura 29 es una representación ilustrativa que muestra la relación espacial de algunos antibióticos, a saber, anisomicina, blasticidina, carbomicina A, y virginiamicina M, unidos a una subunidad ribosómica grande. Las ubicaciones de los antibióticos unidos se muestran con relación al sitio ribosómico A, al sitio P y al túnel de salida de polipéptidos.

Las Figuras 30(A)-(C) son representaciones ilustrativas que muestran un sitio de peptidiltransferasa dispuesto dentro de una gran subunidad ribosómica. La Figura 30(A) muestra una molécula de tilosina unida, e identifica un bolsillo de unión de disacáridos y dos cavidades denotadas "cavidad 1" y "cavidad 2". Las Figuras 30(B) y (C) se proveen en el lado izquierdo para orientar el lector a las ubicaciones del sitio de la peptidiltransferasa (PT) y el túnel de salida de polipéptidos en la subunidad ribosómica grande.

La Figura 31 es una representación esquemática de un sistema de computación útil para el modelado molecular de una subunidad ribosómica y/o para realizar un diseño racional de un fármaco.

La Figura 32 es una representación esquemática de algunos sitios objeto de fármacos potenciales en una subunidad ribosómica grande.

Las Figuras 33(A)-(D) son representaciones ilustrativas que muestran los residuos dentro de la pared del túnel de salida de polipéptidos que están conservados (rojo) o no conservados (azul) entre *E. coli* y ratas. La subunidad ribosómica ha sido cortada hacia abajo del túnel de salida de polipéptidos con una mitad del túnel de salida de

5 polipéptidos mostrada en la Figura 33(A), y la otra mitad del túnel de salida de polipéptidos mostrada en la Figura 33(B). La Figura 33(C) se provee para orientar al lector para mostrar la ubicación de la porción de la subunidad ribosómica mostrada en la Figura 33(A) con relación a la subunidad ribosómica como un todo. La Figura 33(D) se provee para orientar al lector para mostrar la ubicación de la porción de la subunidad ribosómica mostrada en la Figura 33(B) con relación a la subunidad ribosómica grande como un todo.

La Figura 34 es una representación esquemática que muestra la síntesis de dos antibióticos híbridos, esparsocloranfenicol híbridos A (Compuesto 1) y B (Compuesto 2), de los antibióticos individuales esparsoamicina y cloranfenicol.

10 La Figura 35 es una representación esquemática que muestra la síntesis del antibiótico híbrido esparsoanisomicina (Compuesto 3) de los antibióticos individuales esparsoamicina y anisomicina.

La Figura 36 es una representación esquemática que muestra la síntesis de un fragmento de esparsoamicina (Compuesto 9).

La Figura 37 es una representación esquemática que muestra la síntesis de un derivado de cisteína (Compuesto 7) y un fragmento de cloranfenicol (Compuesto 13).

15 La Figura 38 es una representación esquemática que muestra la síntesis del esparsocloranfenicol híbrido A (Compuesto 1).

La Figura 39 es una representación esquemática que muestra la síntesis del híbrido B de esparsocloranfenicol (Compuesto 2).

20 La Figura 40 es una representación esquemática que muestra la síntesis de un fragmento de anisomicina (Compuesto 24).

La Figura 41 es una representación esquemática que muestra la síntesis del híbrido de esparsoanisomicina (Compuesto 3).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

25 Como se usa en la presente, el término "sitio activo" se refiere a regiones en un ribosoma o una subunidad ribosómica que están directamente involucrados en la síntesis de proteínas, por ejemplo, el sitio de la peptidiltransferasa, el sitio A, el sitio P, el túnel de salida de polipéptidos, el sitio de unión del factor de elongación, y otros sitios similares.

30 Como se usa en la presente, los términos "agente", "ligando" y "candidato principal" se usan como sinónimos y se refieren a cualquier átomo, molécula, o grupo químico que se une o interactúa con un ribosoma, una subunidad ribosómica o un fragmento de ribosoma. Así, los ligandos incluyen, pero no están limitados a, un solo átomo pesado, un antibiótico o un análogo o derivado de éste, un ARNt, un peptidil ARNt, un aminoacil ARNt, o una partícula de reconocimiento de señales ("SRP").

35 Como se usa en la presente, "archaebacteria" se refiere al reino de las moneras que incluye productores de metano, especies dependientes del azufre, y muchas especies que toleran ambientes muy salados o calientes.

Como se usa en la presente, el término "sitio A" se refiere al locus ocupado por una molécula de aminoacil-ARNt inmediatamente antes de su participación en la reacción formadora de uniones peptídicas.

Como se usa en la presente, el término "unidad asimétrica" se refiere a un conjunto mínimo de coordenadas atómicas que cuando se opera sobre éste con las operaciones de simetría de un cristal regenerará todo el cristal.

40 Como se usa en la presente, "al menos una porción de" o "al menos una porción de la estructura tridimensional de" se entiende que significa una porción de la estructura tridimensional de un ribosoma o una subunidad ribosómica, incluyendo la distribución de cargas y las características de hidrofiliicidad/hidrofobicidad, formada por al menos tres, más preferentemente al menos tres a diez, y más preferentemente aun al menos diez aminoácidos y/o residuos de nucleótidos del ribosoma o la subunidad ribosómica. Los residuos que forman una porción como ésta pueden ser,
45 por ejemplo, residuos que forman una porción contigua de la secuencia primaria de un ARN ribosómico o proteína ribosómica, residuos que forman una porción contigua de la estructura tridimensional del ribosoma o de la subunidad ribosómica, o una combinación de estos. Como se usa en la presente, los residuos que forman "una porción de la estructura tridimensional de" un ribosoma o de una subunidad ribosómica, forman una forma tridimensional en la cual cada átomo o grupo funcional que forma la porción de la forma está separado del átomo más cercano o del
50 grupo funcional que forma la porción de la forma por no más de 40 Å, preferentemente por no más de 20 Å, más preferentemente por no más de 5-10 Å, y más preferentemente aun por no más de 1-5 Å.

Como se usa en la presente, el término "coordenadas atómicas" o "coordenadas de la estructura" se refiere a

5 coordenadas matemáticas (representadas como valores "X," "Y" y "Z") que describen las posiciones de átomos en un cristal de un ribosoma o de una subunidad ribosómica. Los datos de difracción obtenidos de los cristales se usan para calcular un mapa de densidad electrónica de la unidad de repetición del cristal. Los mapas de densidad electrónica se usan para establecer las posiciones de los átomos individuales en una sola subunidad ribosómica.

10 Los expertos en el arte entienden que un conjunto de coordenadas de estructura determinadas por cristalografía de rayos X no está exento de error estándar. A los fines de esta invención, las estructuras de dos ribosomas, subunidades ribosómicas o porciones de éstas se considera que son iguales si satisfacen uno de los siguientes dos tests. En un primer test, las estructuras se considera que son iguales si un conjunto de coordenadas de estructura para un ribosoma o una subunidad ribosómica de cualquier fuente tiene una desviación del valor cuadrático medio

15 de átomos que no son hidrógeno de menos de aproximadamente 2,0 Å, o más preferentemente menos de aproximadamente 0,75 Å, cuando se superponen en las posiciones de átomos que no son de hidrógeno de las coordenadas atómicas depositadas en el Banco de Datos de Proteínas (PDB, por sus siglas en inglés) del Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) (Berman et al. (2000) *Nucleic Acids Research* 28, 235-242; <http://www.rcsb.org/pdb/>) con los números de acceso PDB ID: 1FFK; PDB ID: 1FFZ; PDB ID: 1FG0; PDB ID: 1JJ2; PDB ID: 1K73; PDB ID: 1KCB; PDB ID: 1K8A; PDB ID: 1KD1; o PDB ID: 1K9M, o contenidos en el Disco 1 de 1, la divulgación de cada uno de los precedentes es incorporada en la presente por referencia en su totalidad. En un segundo test, se considera que las estructuras son iguales si la desviación del valor cuadrático medio entre un conjunto de átomos en una estructura de prueba y un set de átomos correspondiente en una estructura de referencia es menos de 2,0 Å. A los fines de esta prueba, el conjunto de átomos en la estructura de referencia comprende al

20 menos cinco de las series de residuos de ARNr 23S indicados más abajo como 631-633, 835-841, 844-846, 882-885, 1836-1839, 2095-2105, 2474-2478, 2485-2490, 2528-2530, 2532-2543, 2607-2612, 2614-2623, 2642-2648 de la estructura depositada en el PDB bajo el número de acceso PDB ID: 1JJ2 o contenidos como nombre de archivo 1jj2.rtf en el Disco 1 de 1. Los residuos en la estructura de prueba correspondiente a los indicados más arriba son identificados por alineamiento de secuencia usando el programa Lasergene v. 5.0 (DNA Star, Inc., Madison, WI) con los valores por defecto. Específicamente, el programa de computación se usa para alinear aquellos residuos indicados más arriba en la secuencia de ARNr 23 S de *Haloarcula marismortui* con aquellos en el ARNr del organismo de prueba. Una vez alineados, los residuos correspondientes en el ARNr del organismo de prueba son

25 identificados. Las coordenadas atómicas de los átomos del esqueleto (P, C5', 05', C4', C3', 03') de átomos en la estructura de prueba son superpuestos en los átomos del esqueleto correspondiente (P, C5', 05', C4', C3', 03') de la estructura de referencia usando el programa MIDAS Plus (Ferrin et al. (1988) *J. Mol. Graphics* 6: 13-27 y 36-37). Las estructuras de prueba y de referencia se consideran iguales si la desviación del valor cuadrático medio entre los dos conjuntos de átomos después de la superposición es menor de 2,0 Å, según se determinó por MIDAS Plus.

35 En la lista de coordenadas atómicas depositada en el Banco de Datos de proteínas del RCSB o incluidos en la presente como archivos grabados en los discos compactos, el término "coordenada atómica" o coordenadas de la estructura se refiere a la posición medida de un átomo en la estructura en el formato del Banco de Datos de Proteínas (PDB), incluyendo X, Y, Z y B, para cada uno. El término "tipo de átomo" se refiere al elemento cuyas coordenadas se miden. La primera letra en la columna define el elemento. El término "X", "Y", "Z" se refiere a la posición atómica definida cristalográficamente del elemento medido con respecto al origen cristalográfico elegido. El término "B" se refiere a un factor térmico que mide la variación media de una posición de un átomo con respecto a su

40 posición promedio.

Se hace referencia a los conjuntos de coordenadas atómicas y tablas relacionadas incluidas con esta memoria y presentadas en un disco compacto (dos discos compactos en total incluyendo un disco compacto original, y una copia duplicada de los discos compactos originales). El Disco No.º 1 contiene treinta y nueve archivos. El Disco No 1 contiene los archivos identificados como DB1FFK.DOC y PDB1FFK.ENT que representan archivos de coordenadas

45 que definen la subunidad ribosómica grande; PDB 1 FFZ.DOC y PDB1FFZ.ENT que representan archivos de las coordenadas que definen el complejo de subunidad ribosómica grande-CCdA-p-puro; y PDB1FGO.DOC y PDB1FGO.ENT que representa archivos de las coordenadas que definen el complejo de subunidad ribosómica grande - análogo aa-ARNt; 1 JJ2.RTF y 1JJ2.TXT que representa archivos de las coordenadas que definen la subunidad ribosómica grande completamente refinada; anisomicina.pdb, blastidicin.pdb, carbomycin.pdb, sparsomycin.pdb, spiramycin.pdb, tylosin.pdb y virginiamycin.pdb que representan archivos de las coordenadas que definen la subunidad ribosómica grande unida a anisomicina, blastidicina, carbomicina, esparsomicina, espiramicina, tilosina y virginiamicina, respectivamente; tres carpetas: FOLDERA contiene el archivo identificado como 1JJ2.PDB (que representa un archivo de coordenadas más refinadas que definen la subunidad ribosómica grande), FOLDERB contiene los archivos identificados como ANISOMYC.PDB, BLASTICI.PDB, CARBOMYC.PDB, SPARSOMY.PDB, SPIRAMYC.PDB, TYLOSIN.PDB, y VIRGINIA.PDB (que representa archivos de las coordenadas refinadas que definen la subunidad ribosómica grande unida a anisomicina, blastidicina, carbomicina, esparsomicina, espiramicina, tilosina y virginiamicina, respectivamente), FOLDERC contiene los archivos identificados como AZITHROM.PDB, y LINEZOLI.PDB (que representa los archivos de las coordenadas que definen la subunidad ribosómica grande unida a azitromicina y linezólido, respectivamente); el archivo identificado como erythromycin.pdb (que representa un

50 archivo de las coordenadas que definen la subunidad ribosómica grande unida a eritromicina) y azithromycin.pdb y linezólido.pdb (que representan archivos de las coordenadas refinadas que definen la subunidad ribosómica grande unida a azitromicina y linezólido, respectivamente).

Como resultará evidente para los expertos en el arte, las estructuras atómicas presentadas en la presente son

independientes de su orientación, y que las coordenadas atómicas identificadas en la presente representan simplemente una orientación posible de una subunidad ribosómica grande particular. Es evidente, por lo tanto, que las coordenadas atómicas identificadas en la presente pueden ser rotadas matemáticamente, traducidas, aumentadas, o una combinación de estos, sin cambiar las posiciones relativas de los átomos o las características de la estructura respectiva. Tales manipulaciones matemáticas están comprendidas en la presente.

Como se usa en la presente, las expresiones “coordenadas atómicas derivadas de” y “átomos derivados de” se refiere a coordenadas atómicas o a átomos derivados, o bien directamente o indirectamente, de un mapa de densidad electrónica. Se entiende que las coordenadas atómicas o átomos derivados “directamente” de un mapa de densidad electrónica se refieren a coordenadas atómicas o a átomos que son identificados de, y/o ajustados a, un mapa de densidad electrónica, usando técnicas de cristalográficas y/o de modelado molecular convencionales y por lo tanto pueden ser considerados como coordenadas atómicas o átomos primarios. Se entiende que las coordenadas atómicas o átomos derivados “indirectamente” de un mapa de densidad electrónica se refiere a coordenadas atómicas o a átomos que se derivan de, y por lo tanto son derivados o transformaciones de las coordenadas atómicas o átomos primarios y por lo tanto pueden ser considerados como coordenadas atómicas o átomos secundarios. Las coordenadas atómicas o átomos secundarios pueden ser generados de las coordenadas atómicas o de los átomos primarios usando técnicas de modelado molecular convencionales. A modo de ejemplo no limitativo, las coordenadas atómicas para la subunidad ribosómica grande de *H. marismortui*, como se describen más abajo son consideradas coordenadas primarias, mientras que las coordenadas atómicas de una subunidad ribosómica grande de mamífero que pueden ser derivadas de las coordenadas atómicas de *H. marismortui* por modelado molecular, incluyendo, por ejemplo, modelado de homología y/o reemplazo molecular, se considera que son coordenadas secundarias. Ambos tipos de coordenadas atómicas y átomos se considera que están comprendidos por la invención.

Como se usa en la presente los términos “une”, “unir”, “unido”, “unión” o “unidos”, cuando se usan con referencia a la asociación de átomos, moléculas o grupos químicos, se refiere a cualquier contacto físico o asociación de dos o más átomos, moléculas o grupos químicos (por ejemplo, la unión de un ligando con una subunidad ribosómica se refiere al contacto físico entre el ligando y la subunidad ribosómica). Tales contactos y asociaciones incluyen tipos de interacciones covalentes y no covalentes.

Como se usa en la presente, los términos “complejo” o “complejizada” se refieren al ensamble de dos o más moléculas para dar una estructura de orden mayor, tal como, una subunidad ribosómica 50S unida a un ligando.

Como se usa en la presente, la expresión “química computacional” se refiere a cálculos de las propiedades físicas y químicas de las moléculas.

Como se usa en la presente, la expresión “sistema conjugado” se refiere a más de dos enlaces dobles que están posicionados espacialmente de modo que sus electrones están completamente deslocalizados con todo el sistema. Los residuos aromáticos contienen sistemas de enlaces dobles conjugados.

Como se usa en la presente, las expresiones “enlace covalente” o “unión de valencia” se refiere a un enlace químico entre dos átomos en una molécula creada por compartir electrones, usualmente en pares, por los átomos unidos.

Como se usa en la presente, la expresión “cristal” se refiere a cualquier conjunto ordenado tridimensional de moléculas que difracta los rayos X.

Como se usa en la presente, la expresión “origen cristalográfico” se refiere a un punto de referencia en la unidad de celda con respecto a la operación de simetría cristalográfica.

Como se usa en la presente, la expresión “dominio de unión del factor de elongación” se refiere a la región del ribosoma que interactúa directamente con factores de elongación, incluyendo, por ejemplo, los factores de elongación, EF-Tu y EF-G.

Como se usa en la presente, la expresión “sitio E” se refiere al locus ocupado por una molécula de ARNt desacilada cuando sale del ribosoma después de su participación en la formación de la unión peptídica.

Como se usa en la presente, la expresión “derivación del átomo pesado” se refiere al método de producir una forma químicamente modificada, también conocida como un “derivado de un átomo pesado”, de un cristal del ribosoma y la subunidad ribosómica y sus complejos. En la práctica, un cristal está embebido en una solución que contiene sales de átomos pesados, o compuestos organometálicos, por ejemplo, cloruros de mercurio, fosfato de etil-mercurio, pentamina de osmio o pentamina de iridio, que puede difundirse a través del cristal y unirse al ribosoma o la subunidad ribosómica. La o las ubicaciones del o de los átomos de metales pesados unidos pueden ser determinadas por análisis de difracción de rayos X del cristal embebido. Esta información, a su vez, se usa para generar la información de fases usada para construir la estructura tridimensional del complejo (Blundell *et al.* (1976) *supra*).

Como se usa en la presente, el término “homólogo” se entiende que significa una cualquiera o una combinación de (i) cualquier proteína aislada o aislable de un ribosoma o una subunidad ribosómica (es decir, una proteína

- ribosómica), (ii) cualquier secuencia de ácidos nucleicos aislada o aislable de un ribosoma o una subunidad ribosómica (es decir, un ARN ribosómico), (iii) cualquier proteína que tiene al menos 25% de identidad de secuencia con respecto a una proteína ribosómica aislada de *E. coli* o de *Rattus norvegicus* según se determinó usando el programa de computación “BLAST” versión número 2.1.1 implementando todos los parámetros por defecto, o (iv) cualquier ácido nucleico que tiene al menos 30% de identidad de secuencia con respecto a un ARN ribosómico aislado de *E. coli* o *Rattus norvegicus* según se determinó usando el programa de computación “BLAST” versión número 2.1.1 implementando todos los parámetros por defecto. “BLAST” versión número 2.1.1 se encuentra disponible y accesible vía la world wide web en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> o puede ser operado localmente como un programa completamente ejecutable en un ordenador independiente.
- 10 Como se usa en la presente, el término “modelado de homología” se refiere a la práctica de derivar modelos para estructuras tridimensionales de macromoléculas de estructuras tridimensionales existentes para sus homólogos. Los modelos de homología se obtienen usando programas de computación que hacen posible alterar la identidad de residuos en las posiciones, en donde la secuencia de la molécula de interés no es la misma que la de la molécula de estructura conocida.
- 15 Como se usa en la presente, la expresión “enlace de hidrógeno” se refiere a dos átomos electronegativos (o bien O o N), que comparten un hidrógeno que está unido en forma covalente a un sólo átomo, mientras interactúa con el otro.
- Como se usa en la presente, la expresión “interacción hidrófoba” se refiere a interacciones realizadas por dos residuos hidrófobos.
- 20 Como se usa en la presente, las expresiones “IC₅₀” o “concentración inhibitoria 50” se entiende que significan la concentración de una molécula que inhibe 50% de la actividad de un proceso biológico de interés, incluyendo, sin limitación, la viabilidad celular y/o la actividad de traducción de proteínas.
- Como se denominan en la presente, las proteínas ribosómicas son denominadas “LX” o “SX”, en donde L significa “subunidad grande”; S significa “subunidad pequeña”; y X en cualquiera de los casos es un entero.
- 25 Como se usa en la presente, el término “MIR” se refiere a reemplazo isomorfo múltiple, una técnica usada para derivar información de fases de cristales tratados con compuestos de átomos pesados.
- Como se usa en la presente, el término “gráficos moleculares” se refiere a representaciones tridimensionales de átomos, preferentemente en una pantalla de ordenador.
- 30 Como se usa en la presente, las expresiones “modelo molecular” o “estructura molecular” se refieren al ordenamiento tridimensional de átomos en un objeto particular (por ejemplo, la estructura tridimensional de los átomos que comprenden un ribosoma o una subunidad ribosómica, y los átomos que comprenden un ligando que interactúa con un ribosoma o una subunidad ribosómica, particularmente con una subunidad ribosómica grande, más particularmente con una subunidad ribosómica 50S).
- 35 Como se usa en la presente, la expresión “modelado molecular” se refiere a un método o procedimiento que puede ser realizado con o sin un ordenador para realizar uno o más modelos, y, opcionalmente, para realizar predicciones acerca de relaciones de actividad de estructuras de ligandos. Los métodos usados en el modelado molecular abarcan desde gráficos moleculares a química computacional.
- 40 Como se usa en la presente, la expresión “reemplazo molecular” se refiere a un método que involucra la generación de un modelo de un ribosoma o una subunidad ribosómica cuyas coordenadas atómicas son desconocidas, orientando y posicionando las coordenadas atómicas descritas en la presente invención en la unidad de celda de los cristales del ribosoma desconocido de modo explicar mejor el modelo de difracción observado del cristal desconocido. Las fases pueden ser calculadas luego de este modelo y combinadas con las amplitudes observadas para dar las coordenadas atómicas del ribosoma o de la subunidad ribosómica desconocidos. Este tipo de método se describe, por ejemplo, en The Molecular Replacement Method, (Rossmann, M.G., ed.), Gordon & Breach, Nueva York, (1972).
- 45 Como se usa en la presente, la expresión “enlace no covalente” se refiere a una interacción entre átomos y/o moléculas que no involucra la formación de un enlace covalente entre ellos.
- Como se usa en la presente, la expresión “sitio de peptidiltransferasa” se refiere al locus en la subunidad ribosómica grande en donde se sintetizan los enlaces peptídicos.
- 50 Como se usa en la presente, la expresión “túnel de salida de polipéptidos” se refiere al canal que pasa a través de la subunidad ribosómica grande desde el sitio de la peptidiltransferasa al exterior del ribosoma a través del cual pasan los polipéptidos recién sintetizados.
- Como se usa en la presente, la expresión “inhibidor de la síntesis de proteínas” se refiere a cualquier molécula que puede reducir, inhibir o interrumpir de otro modo la síntesis de proteínas o polipéptidos en un ribosoma.

Como se usa en la presente, la expresión “sitio P” se refiere al locus ocupado por un peptidil-ARNr en el momento en que participa en la reacción formadora de enlaces peptídicos.

5 Como se usa en la presente, la expresión “locus ribofuncional” se refiere a una región del ribosoma o de la subunidad ribosómica que participa, ya sea activamente o pasivamente, en la síntesis de proteínas o de polipéptidos en el ribosoma o la subunidad ribosómica y/o exporta o transloca una proteína o polipéptido fuera de un ribosoma. El locus ribofuncional puede incluir, por ejemplo, una porción de un sitio de una peptidiltransferasa, un sitio A, un sitio P, un sitio E, un dominio de unión del factor de elongación, un túnel de salida de polipéptidos, y un dominio de unión de una partícula de reconocimiento de señales (SRP). Se entiende que el locus ribofuncional no sólo tendrá una cierta topología sino que también tendrá una química de superficie particular definida por átomos que, por ejemplo, participan en el enlace de hidrógeno (por ejemplo, dadores de protones y/o aceptores), tienen propiedades electrostáticas específicas y/o carácter hidrófilo o hidrófobo.

10 Como se usa en la presente, la expresión “subunidad ribosómica” se refiere a una de las dos subunidades del ribosoma que puede funcionar independientemente durante la fase de iniciación de la síntesis de proteínas, pero que juntas constituyen un ribosoma. Por ejemplo, un ribosoma procariótico comprende una subunidad 50S (subunidad grande) y una subunidad 30S (subunidad pequeña).

15 Como se usa en la presente, el término “ribosoma” se refiere a un complejo que comprende una subunidad ribosómica grande y una subunidad ribosómica pequeña.

Como se usa en la presente, la expresión “dominio de unión de partículas de reconocimiento de señales” se refiere a la porción del ribosoma que interactúa directamente con la partícula de reconocimiento de señales.

20 Como se usa en la presente, la expresión “grupo espacial” se refiere al ordenamiento de elementos de simetría de un cristal.

Como se usa en la presente, la expresión “operación de simetría” se refiere a una operación en el grupo espacial dado que coloca a los átomos en una unidad asimétrica en los átomos correspondientes en otra unidad asimétrica.

25 Como se usa en la presente, el término “maclado” se refiere a un solo cristal macroscópico que contiene dominios microscópicos de la misma simetría que difieren significativamente en orientación de tal modo que los modelos de difracción de todos están superpuestos. En un cristal maclado los bloques de mosaicos, o dominios, están orientados de tal modo que algunos apuntan en una dirección y otros apuntan en una segunda dirección, claramente diferente, y las direcciones son tales que el modelo de difracción generado por un grupo de bloques cae exactamente sobre el modelo de difracción del otro grupo.

30 Como se usa en la presente, la expresión “no maclado” se refiere a una celda de cristal cuyos dominios están alineados. Los dominios también son conocidos como los “bloques de mosaicos”. La mayoría de los cristales difractan como si fueran conjuntos de bloques de mosaicos. Se puede pensar en estos como regiones pequeñas, perfectamente ordenadas, dentro del cristal más grande, el que en general no está tan bien ordenado. Cada bloque tiene la misma simetría y empaquetamiento de la unidad de celda que todos los otros.

35 Como se usa en la presente, la expresión “unidad de celda” se refiere a un bloque de forma básica de paralelepípedo. Todo el volumen del cristal puede estar construido por ensamblado regular de tales bloques. Cada unidad de celda comprende una representación completa de la unidad del modelo, cuya repetición forma el cristal.

II. Estructura y uso de la subunidad ribosómica grande

A. Estructura atómica de la subunidad ribosómica grande a una resolución de 2,4 Å, refinamiento inicial

40 La presente invención se basa, en parte, en el desarrollo de un nuevo método para preparar cristales de ribosomas. El nuevo método provee cristales de la subunidad ribosómica 50S que son muchos más gruesos que aquellos disponibles antes y que pueden difractar los rayos X a una resolución de aproximadamente 2,4 Å. El método elimina el maclado de los cristales que obstruyó el progreso en la determinación de la estructura cristalina de la subunidad ribosómica 50A de *H. marismortui* durante muchos años. El método de preparación de los cristales de la subunidad ribosómica 50S se comenta más abajo.

45 La presente invención también se basa, en parte, en la estructura atómica del cristal de la subunidad ribosómica 50S de *H. marismortui* que ha sido derivada de un mapa de densidad electrónica de 2,4 Å de resolución que fue faseado experimentalmente usando derivados de átomos pesados. Las coordenadas atómicas que definen la unidad ribosómica grande fueron depositadas el 10 de julio de 2000, en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) en el Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) (Berman et al. (2000) *Nucleic Acid Research* 28, 235-242; <http://www.rcsb.org/pdb/>) bajo el número de acceso PDB ID: 1FFK.

Además, la presente invención se basa, en parte, en la derivación de las coordenadas atómicas del siguiente modelo que se resume brevemente aquí y se comenta en detalle en las siguientes secciones de la memoria. Este modelo incluye 2.811 de los 2.923 nucleótidos de ARNr 23S, los 122 nucleótidos de su ARNr 5S, y las estructuras

para las 27 proteínas que están bien ordenadas en la subunidad.

Las estructuras secundarias de ambos ARNr 5S y 23S son notablemente cercanas a aquellas deducidas para ellos por comparación filogenética. La estructura secundaria del ARNr 23S lo divide en 6 dominios grandes, cada uno de los cuales tiene una estructura terciaria altamente asimétrica. A pesar de las irregularidades de sus formas, los dominios se ajustan entre sí de una manera entrelazada para dar una masa compacta de ARN que es casi isométrica. Las proteínas son dispersadas a través de la estructura, concentradas en gran parte en su superficie, pero son mucho menos abundantes en las regiones de la subunidad que son de un significado funcional primario para las síntesis de proteínas - la interfase de la subunidad 30S, las regiones de unión para tARN y el sitio activo de la peptidiltransferasa. La característica más sorprendente de muchas de estas proteínas son las estructuras irregulares extendidas de sus bucles y términos, que penetran entre las hélices de ARN. El rol primario de la mayoría de las proteínas en la subunidad parece ser la estabilización de la estructura tridimensional de su ARNr.

1. Preparación del cristal para la subunidad ribosómica 50S y determinación de la estructura

Se usaron varias propuestas experimentales para extender la resolución de los mapas de densidad electrónica de la subunidad ribosómica 50S de *H. marismortui* de 5 Å a 2,4 Å incluyendo mejoras en los cristales. Un procedimiento de retroextracción fue desarrollado para cultivar los cristales de manera reproducible que son mucho más gruesos que aquellos disponibles antes y pueden difractar a una resolución de 2,2 Å (ver, Ejemplo 1). Brevemente, los cristales fueron cultivados a temperatura ambiente en gotas colgantes por difusión de vapor de soluciones sembradas retro-extraídas de subunidades precipitadas. Los cristales que resultaron tenían dimensiones máximas de 0,5 x 0,5 x 0,2 mm y fueron cosechados después de tres semanas. El maclado de cristales que obstruyó el progreso durante muchos años (Ban *et al.* (1999) *supra*) fue eliminado ajustando las condiciones de estabilización de cristales (ver, Ejemplo 1). Los cristales fueron estabilizados por transferencia gradual en una solución que contenía 12% de PEG 6000, 22% de etilenglicol, 1,7 M de NaCl, 0,5 M de NH₄Cl, 100 mM de acetato de potasio, 30 mM de MgCl₂ y 1 mM de CdCl₂, pH 6,2, y fueron congelados en forma instantánea (*flash*) en propano líquido. Reduciendo la concentración de sal por debajo de 1,7 M de NaCl (KCl) se aumentó la tendencia de los cristales a maclarse. A concentraciones de sal tan bajas como 1,2 M casi todos los cristales fueron maclados.

Todos los rayos X usados para faseado de alta resolución fueron recogidos en el Brookhaven National Synchrotron Light Source excepto dos conjuntos de datos nativos usados, que fueron recogidos en el Advanced Foton Source en Argonne (ver Ejemplo 2) (Tabla 1). Los derivados de la pentamina de osmio (132 sitios) y la hexamina de iridio (84 sitios) probaron ser los más efectivos para producir el reemplazo isomorfo y la información de fases de dispersión anómalas a una resolución de 3,2 Å (ver Ejemplo 2). Promediar la densidad inter-cristales, lo que había contribuido significativamente a una resolución más baja, no ayudó a una resolución más allá de aproximadamente 5 Å. Los mapas de densidad electrónica mejoraron notablemente y sus resoluciones se extendieron, eventualmente a 2,4 Å, usando el procedimiento de girado de solvente en CNS (Abrahams *et al.* (1996) *Acta Crystallogr. D* 52: 30; Brünger *et al.* (1998) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54: 905-921).

Tabla 1
Estadística para la recolección de datos, determinación de fases y construcción del modelo

M1RAS1		MIRAS2		Nativo1 Os(NH ₃) ₅ ²⁺			
UO ₂ F ₅ ³⁻ Nativo2		Ir(NH ₃) ₆ ³⁺	Os(NH ₃) ₆ ³⁺	Ta ₆ Br ₁₂ ²⁺			
Conc. átomos pesados (mM)	-	30,0	0,5	-	20,0	4,5	3,0
Tiempo embebido (hs)	-	1,5	4	-	24 hs	24 hs	24 hs
Sitios no.	-	132	20	-	84	38	9
Resolución (Å) (*)	90-2,4 (25-2,4)	40-3,5 (3,6-3,5)	40-3,8 (3,9-3,8)	30-2,9 (3,0-2,9)	30-3,2 (3,27-3,20)	30-3,5 (3,6-3,5)	30-3,8 (3,97-3,80)
λ(Å)	1,00	1,14	1,30	1,00	1,075	1,14	1,255
Observaciones	6.089.802	1.308.703	596.166	2.832.360	1.823.861	1.646.468	1.288.524
Único	665.928	429.761	313.863	390.770	541.488	488.275	346.745
Redun. (*)	9,1 (6,5)	3,0 (2,5)	1,9 (1,6)	7,2	3,4	4,3 (4,2)	3,7
Completo (*)	95,6 (71,0)	99,4 (96,8)	92,0 (54,1)	97,1	93,8	98,1 (99,0)	99,5
I/σ (Último bin)	25,5 (1,9)	13,5 (3,3)	8,9 (1,6)	18,0 (6,4)	12,0 (2,6)	10,6 (2,7)	10,8 (3,2)
R _{unión} (*)	8,6 (69,1)	7,2 (32,0)	9,1(37,9)	11,2(36,9)	8,5(29,5)	12,1 (46,0)	12,1 (40,5)
O2 (ano) (*)	-	2,8 (1,0)	1,5 (1,0)	-	2,63 (1,48)	1,8 (1,0)	2,42 (1,18)
R _{unión} (ano)	-	6,2	8,0	-	6,7	6,9	-
R _{iso}	-	14,1(22,7)	26,4 (47,0)	-	12,9 (28,1)	19,5 (39,4)	-

Estadísticas de faseado		Capas de resolución (Å): - 73.200 reflexiones por bin							
MIRAS1 (FOM)	30,0	0,52	5,1	0,31	4,0	0,14	3,5	3,2	Total
Os(NH ₃) ₅ ²⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	0,32
Poder de faseado	-	-	0,87	0,58	0,72	0,26	0,66	-	0,75
Poder de faseado (SAD)	-	1,40	0,62	0,65	0,67	0,67	0,67	-	0,65
R _{cuilias} (céntrico)	-	-	0,47	0,33	0,33	0,28	0,28	-	0,36
UO ₂ F ₅	-	-	0,46	0,25	0,25	-	-	-	0,36
Poder de faseado (SAD)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,36

(continuación)
Estadísticas de faseado

Capas de resolución (Å): - 73.200 reflexiones por bin

R _{cuillis} (céntrico)	0,72	0,77	0,75	-	0,75
MIRAS2 (FOM)	0,48	0,40	0,28	0,12	0,33
Ir(NH ₃) ₆ ³⁺					
Poder de faseado	1,02	0,92	0,78	0,66	0,89
Poder de faseado (SAD)	2,02	1,60	1,22	0,83	1,47
R _{cuillis} (céntrico)	0,58	0,63	0,70	0,74	0,63
Os(NH ₃) ₆ ³⁺					
Poder de faseado	0,62	0,57	0,58	0,58	0,59
Poder de faseado (SAD)	0,47	0,39	-	-	0,42
R _{cuillis} (céntrico)	0,78	0,78	0,78	0,76	0,78
Ta ₆ Br ₁₂ ²⁺ (Usado para faseado SAD solamente)					
Poder de faseado (SAD)	2,77	0,35	0,13	-	1,19
FOM	0,76	0,51	0,31	0,14	0,37
(MIRAS1+MIRAS2+SAD)					

Estadísticas del modelo

Rango de resolución (Å)	90,0-2,4	desviaciones rms:	Factores B promedio (Å ²)
Reflexiones	577.304	Uniones (Å)	Todos los átomos
R _{rysa} (%)	25,2	Ángulos (°)	23S rARN
R _{libre} (%)	26,1	Dihédricos (°)	5S rARN
		Impropios (°)	Factores B mínimo/máx. (Å ²)
			70/107,9

λ, longitud de onda; Redun., redundancia; (*) capa de última resolución.

R_{iso}: $\sum |F_{PH}-F_P|/\sum F_{PH}$, en donde F_{PH} y F_P son el derivado y las amplitudes del factor de estructura nativa, respectivamente. R_{sim}: $\sum \sum |I(h)-I(h')|/\sum \sum I(h)$, en donde I(h) es la intensidad media después de reflexiones. Poder de faseado: media cuadrática de la diferencia isomorfa dividida por la media cuadrática residual falta de cierre. Rcuillis: $\sum (|F_{PH}-F_P| - |F_H(\text{calc})|)/\sum |F_{PH}-F_P|$, en donde F_{PH} es el factor de estructura del derivado y F_P es el de los datos nativos. La sumatoria es válida sólo para la reflexión céntrica. FOM (figura de mérito): valor medio del coseno del error en los ángulos de fases. Abreviaturas: MIRAS: reemplazo isomorfo múltiple, dispersión anómala; SAD: difracción anómala de longitud de onda simple; FOM: figura de mérito. Excepto por las regiones oscurecidas por desorden, las experimentalmente faseadas, mapa de densidad electrónica de 2,4 Å de resolución era de calidad suficiente de modo que los errores de secuenciación de la proteína y el ácido nucleico podían ser identificados y corregidos. Cada nucleótido podría ser ajustado individualmente y la diferencia entre A y G era usualmente clara sin referencia a la secuencia química, como lo era la distinción entre purinas y pirimidinas (Figura 1).

La sustracción del modelo atómico del mapa de densidad electrónica experimental no deja una densidad significativa excepto para agua y iones, mostrando que el modelo explica toda la densidad macromolecular. Se logró un refinamiento preliminar del modelo usando un objetivo mixto en el programa CNS (Brünger *et al.* (1998) *supra*). El modelo fue refinado ulteriormente en el espacio real contra el mapa de densidad electrónica de 2,4 Å usando el programa TNT (Tronrud (1997), *Macromolecular Crystallography, Part B, Methods In Enzymology*), que dio un modelo con un factor R libre de 0,33. Una vuelta adicional de refinamiento objetivo mixto de las posiciones atómicas y los factores B usando CNS llevó a la estructura descrita más abajo. Su factor R libre es de 0,27 (Tabla 1).

2. Ajuste de secuencias e identificación de proteínas.

La secuencia de ARNr 23S se ajustó en el mapa de densidad electrónica nucleótido por nucleótido partiendo de su secuencia de bucle de sarcina/ricina (A2691-A2702) (*E. coli* números A2654 a A2665), cuya posición había sido determinada a una resolución de 5 Å (Ban *et al.* (1999) *supra*). Guiados por la información disponible acerca de las estructuras secundarias de ARNs 23S (Gutell, R.R. (1996), "Comparative Sequence Analysis and the Structure of 16S and 23S rARN," *Ribosomal RNA. Structure, Evolution, Processing, and Function in Protein Biosynthesis*, (Dahlberg A. y Zimmerman B., eds.), CRC Press, Boca Ratón, FL pp. 111-128), la densidad electrónica de ARN remanente alojó claramente la secuencia de 5S ARNr. La interpretación de la densidad electrónica de la proteína correspondiente a la proteína fue más complicada porque cada región de proteína tenía que ser identificada químicamente antes de que la secuencia apropiada podía ser ajustada en ella, pero alrededor de 4.000 residuos de aminoácidos fueron ajustados en la densidad electrónica.

La subunidad 50S de *H. marismortui* parece contener treinta y una proteínas, y hay secuencias en el banco de datos Swiss-Prot para veintiocho de las treinta y una proteínas, incluyendo una, HMS6 o L7ae, que fue asignada originalmente a la subunidad ribosómica pequeña (Whittmann-Liebold *et al.* (1990) *supra*). Las tres proteínas restantes fueron identificadas usando las secuencias de las proteínas ribosómicas de los eucariotas y otras especies de archeas como guías. No se halló densidad electrónica para una de las proteínas de subunidad ribosómica grande de *H. marismortui* en la base de datos de secuencias, LX. O bien la asignación de LX a la subunidad grande es un error, o LX está asociada con una región desordenada de la subunidad, o LX está ausente de las subunidades examinadas en general.

El mapa de densidad electrónica de 2,4 Å de resolución no tiene una densidad electrónica clara para las proteínas L1, L10, L11, y L12, cuyas posiciones se conocen de estudios anteriores de rayos X y/o microscopía electrónica de baja resolución. Estas proteínas son componentes de las dos protuberancias laterales de la subunidad, que están ambas ordenadas pobremente en estos cristales. L1 es el único componente de proteína de una de ellas (Oakes, M. *et al.* (1986)), *Structure, Function and Genetics of Ribosomes*, (Hardesty, B. y Kramer, G., eds.) Springer-Verlag, Nueva York, NY, 47-67) y es evidente en los mapas de densidad de resolución 9 Å de la subunidad (Ban *et al.* (1998) *supra*), pero no a resoluciones mayores. L10, L11 y L12 son componentes de la otra protuberancia, que es denominada frecuentemente el "tallo" de L7/L12 (Oakes *et al.* (1986) *supra*). L11 y el ARN al cual se une fueron ubicadas en el mapa de densidad electrónica de 5 Å de resolución de la subunidad grande de *H. marismortui* (Ban *et al.* (1999) *supra*) usando las estructuras cristalinas determinadas independientemente de ese complejo (Conn GL *et al.* (1999) *Science* 284: 1171-1174; Wimberly *et al.* (1999) *Cell* 97: 491-502). Un fragmento de proteína (aproximadamente 100 residuos) que está asociado con el tallo de ARN que soporta el complejo de L11 se puede ver en el mapa con una resolución de 2,4 Å. En base a la ubicación, tiene que ser parte de L10. No hay una densidad electrónica correspondiente a L12 vista a cualquier resolución, pero se sabe que el tetrámero de L12 está unido al ribosoma a través de L10, y se sabe que el conjunto de L10/L12 es flexible bajo ciertas circunstancias (Moller *et al.* (1986) *Structure, Function, and Genetics of Ribosomes*, *supra*, pp. 309-325), lo que puede explicar su invisibilidad aquí.

Las estructuras de los homólogos eubacterianos de las proteínas L2, L4, L6, L14, y L22 han sido determinadas previamente en su totalidad o en parte (ver Tabla 2). L2, L6 y L14 fueron ubicadas inicialmente en el mapa de 5 Å de resolución (Ban *et al.* (1999) *supra*). L4 y L22 han sido identificadas ahora y posicionadas de la misma forma. La densidad electrónica correspondiente a la mayoría de las proteínas restantes fue asignada comparando las longitudes de cadenas y los motivos de secuencias deducidos del mapa de densidad electrónica con longitudes de secuencias conocidas, guiados por la información disponible acerca de las posiciones relativas de las proteínas (Walleczek *et al.* (1988) *EMBO J.* 7: 3571-3576) y las interacciones de las proteínas con ARNr 23S y ARNr 5S (Ostergaard *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.* 284: 227-240). Cada una de las regiones de densidad electrónica de las proteínas así identificadas está bien representada por su secuencia de aminoácido.

La proteína más importante identificada por la similitud de secuencias fue la L7ae, que primero pareció ser la L30e. La identificación de la L30e pareció plausible debido a que la estructura de levadura de la L30 se superpone claramente con la densidad electrónica de la L7ae, y la estructura del ARN a la cual se une la L7ae se asemeja mucho a la del ARN al cual se une la levadura de L30 (Mao, H. *et al.* (1999) *Nat. Struct. Biol.* 6: 1139-1147). No obstante, la secuencia de HMS6, que por similitud de secuencias es un miembro de la familia de la proteína L7ae, se ajusta mejor a la densidad electrónica. Cuatro de las otras proteínas identificadas por similitud de secuencias, L24e, L37e, L37ae y L44e, contienen motivos de dedo de zinc. Los homólogos de rata de L37e y L37ae fueron predichos como siendo proteínas de dedo de zinc en base a sus secuencias (Wool *et al.* (1995) *supra*), y esta predicción ayudó a identificar a sus homólogos en *H. marismortui*.

ES 2 448 815 T3

Tabla 2

Proteínas de subunidad grande de <i>Haloarcula marismortui</i>											
				Interacciones ⁵							
Nombre ¹	Hmlg ²	Lng ³	Conf ⁴	1	2	3	4	5	6	5S	Proteínas
L1*		211	glb					+			ninguna
L2†	RL8	239	glb+ext		+	+	+	+			(L37ae)
L3	RL3	337	(L37ae)		+		+	+	+		L14, L24e, (L13)
L4†	RL4	246	glb+ext	+	+			À			(L18e), (L24), (L37e)
L5	RL11	176	glb					+		+	L18
L6	RL9	177	glb		À			À	+		(L13)
L10*	RP0	348	glb?		+						L12
L11*	RL12	161	glb								ninguna
L12*	RL1/2	115	glb								L10
L13	RL13a	145	glb		+			À	À		(L3), (L6)
L14	RL23	132	glb				+	+	+		L3, L24e
L15	RL27a	164	glb+ext	+	+			+			(L18e), (L32e)
L18	RL5	186	glb+ext		À			+		+	L5, L21e
L19	RL19	148	glb+ext		+	+	+		À		ninguna
L22	RL17	154	glb+ext	+	À	+	+	+	+		ninguna
L23	RL23a	84	glb	À		+					L29, (L39e)
L24	RL26	119	glb+ext	+							(L4)
L29	RL35	70	glb	+							L23
L30	RL7	154	glb		+					+	ninguna
L18e	RL18	115	glb		+						(L4), (L15)
L21e	RL21	95	glb		+			+		À	L18
L24e	RL24	66	glb				À		+		L3, L14
L31e	RL31	91	glb			+	+		+		ninguna
L32e	RL32	240	glb	À	+						(L15)

L37e	RL37	56	glb+ext	+	+	+	Å				(L4)
L39e	RL39	49	est	+		+					(L23)
L44e	RL36a	92	glb+ext	+			Å	+			(L15e)
L7ae	R17a	110	glb	Å							L15e
L10e	RL10	163	glb		+			+		Å	ninguna
L15e	RL15	184	glb+ext	+	Å	Å	Å	+			(L44e), L7ae
L37ae	RL37a	72	glb+ext		+	+	+				L2

El bloque superior de proteínas incluye todas aquellas de las que se conoce que tienen homólogos eubacterianos del mismo nombre. El segundo bloque indica las proteínas halladas en la subunidad ribosómica grande de *H. marismortui* que sólo tienen homólogos eucarióticos (Wittmann-Liebold *et al.* (1990) *supra*). Sus nombres están seguidos por la letra “e” para distinguirlos de las proteínas eubacterianas que de otro modo tendrían el mismo nombre. El tercer bloque son proteínas de subunidad grande para las cuales no existe aún una secuencia de *H. marismortui*. Son identificadas por la homología de secuencias usando nombres L estándar.

¹ Las estructuras de todos o parte de los homólogos de las siguientes proteínas se determinaron previamente: L1 (Nevskaya *et al.* (2000) *Struct. Fold. Des.* 8: 363), L2 (Nakagawa, A. *et al.* (1999) *EMBO J.* 18: 1459-1467), L4 (Wahl *et al.* (2000) *EMBOJ.* 19: 807-818), L6 (Golden *et al.* (1993) *EMBOJ.* 12: 4901-4908), L11 (Conn *et al.* (1999) *supra*; Wimberly *et al.* (1999) *supra*; Markus *et al.* (1997) *Nature Struct. Biol.* 4: 70-77), L12 (Leijonmarck, M. *et al.* (1980) *Nature* 286: 824-827), L14 (Davies *et al.* (1996) *Structure* 4: 55-66), L22 (Unge *et al.* (1998) *Structure* 6: 1577-1586), L30 (Wilson *et al.* (1986) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 83: 7251-7255). Todas las otras estructuras, excepto la 10, han sido determinadas recién en este estudio.

² Homólogo de rata. Equivalentes de rata con relación a las proteínas de *H. marismortui* son de (Mao *et al.* (1999) *supra*).

³ Longitud de la cadena de secuencias.

⁴ Conformación: glb = globular; ext = extensión

⁵ Las interacciones de las proteínas con los 6 dominios de ARNr 23S, ARNr 5S y otras proteínas se especifica. (+) implica que la interacción es sustancial. (A) implica una interacción débil, tangencial. Los nombres de las proteínas que se muestran en paréntesis implican que las interacciones son débiles; de otro modo, la interacción es sustancial.

* Todas las entradas así designadas describen proteínas que no están representadas completamente en los mapas de densidad electrónica aquí descritos. La información resumida se deriva de fuentes de la literatura y está incluida aquí para completar.

† La estructura disponible para esta proteína en aislamiento no incluye la o las extensiones informadas aquí.

3. Aspecto general de la subunidad.

5 En su vista en corona (ver Figura 2), la subunidad ribosómica grande, que es de aproximadamente 250 Å a través, presenta su superficie que interactúa con la subunidad pequeña al observador con las tres proyecciones que irradian de esa superficie apuntada. Aunque la protuberancia que incluye L1 no es visible en el mapa de densidad electrónica de 2,4 Å de resolución, la estructura de L1, que ha sido determinada independientemente (Nikonov *et al.* (1996) *EMBO J.* 15: 1350-1359), ha sido posicionada aproximadamente en mapas de resolución más baja (Ban *et al.* (1998) *supra*) y está incluida aquí para orientar al lector. Es evidente que, excepto por sus dos protuberancias laterales, la subunidad ribosómica grande es monolítica. No hay un indicio de una división de su estructura en dominios topológicamente separados. Además, en parte porque no tiene una subestructura de dominio evidente, pero también porque es tan grande, es imposible abarcarla mirándola como un todo. Para brindar al lector un sentido de cómo se ensambla esto, la subunidad tiene que ser dividida en sus componentes químicos.

4. Estructura secundaria de ARN.

Todos los pares de bases en el ARNr 23S de *H. marismortui* estabilizados por al menos dos enlaces de hidrógeno

fueron identificados usando un programa de computación que investigó la estructura para los dadores y aceptores de los enlaces de hidrógeno separados por menos de 3.2 Å. Las bases unidas por al menos dos de tales enlaces se consideraron apareadas si el ángulo entre sus perpendiculares era menor de 45°, y el ángulo entre enlaces y perpendiculares de las bases era también menor de 45°. En base a los resultados de este análisis, se preparó un diagrama de estructura secundaria en el formato estándar para ARNs 23S/28S (ver Figura 3). La estructura secundaria predicha para esta molécula por comparación filogenética fue notablemente correcta, pero no halló todos los apareamientos terciarios y falló en identificar las interacciones que involucran bases conservadas. Además de los pares de bases de casi cada tipo, el ARN contiene numerosos ejemplos de motivos de estructura secundaria bien conocidos, tales como tripletes de bases, tetrabucles, y tallos de purina de hebra cruzada, pero no se identificaron hasta ahora motivos de estructura secundaria sorprendentemente nuevos.

La estructura secundaria de este ARNr 23S consiste en un bucle central que está cerrado por un tallo terminal, del cual irradian 11 tallos/bucles más o menos complicados. Es costumbre describir la molécula como consistiendo de 6 dominios, y numerar sus tallos helicoidales partiendo secuencialmente del extremo 5' (ver, Figura 4) (Leffers *et al.* (1987) *supra*). La división de la molécula en dominios mostrados en la Figura 4 se desvía de la práctica estándar con respecto a la hélice 25, que es considerada usualmente parte del dominio I. Está colocada en el dominio II porque interactúa más fuertemente con el dominio II que con los otros elementos del dominio I.

Hay cinco secuencias más largas que los 10 nucleótidos en ARNr 23S cuyas estructuras no pueden ser determinadas del mapa de 2,4 Å de resolución debido al desorden. En conjunto representan 207 de los 232 nucleótidos que faltan en el modelo final. Las regiones desordenadas son: (1) todas las de la hélice 1, (2) el extremo distal de la hélice 38, (3) la hélice 43/44 a la cual se une la proteína ribosómica L11, (4) el extremo del bucle del tallo/bucle 69, y (5) la hélice 76/77/78, que es la estructura de ARN a la cual se une la L1. Para completar, estas regiones están incluidas en la Figura 3 (en gris) con sus estructuras secundarias determinadas filogenéticamente.

5. Arquitectura general de ARNr.

Los seis dominios de ARNr 23S y ARNr 5S tienen todas formas de convoluta, complicadas, que no obstante concuerdan entre sí para producir una masa de ARN monolítica, compacta, (ver Figuras 4(A) y 4(B)). Así, a pesar de la organización de su ARNs en el nivel de la estructura secundaria, en tres dimensiones, la subunidad grande es un dominio gigante, individual. A este respecto, es bastante diferente de la subunidad pequeña, que es un objeto más aplanado, que no es monolítico. Aun en micrografías electrónicas de baja resolución, la subunidad pequeña consiste en tres dominios estructurales, cada uno de los cuales, a su vez, contiene una de los tres dominios de estructura secundaria de su ARN (Noller *et al.* (1990) *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution, supra*, pp. 73-92). Esta diferencia cualitativa entre las dos subunidades puede reflejar un requerimiento para la flexibilidad conformacional que es mayor para la subunidad pequeña.

El dominio I, que se asemeja a un hongo (ver, Figura 4(E)), se encuentra en la parte posterior de la partícula, detrás y debajo de la región L1. La parte delgada del dominio comienza en la cercanía del dominio VI, que es donde se encuentran ubicados su primer y sus últimos residuos. Las hélices 1 y 25 abarcan la partícula en la parte posterior y luego el dominio se expande en una estructura más globular, más grande, debajo y detrás de la región L1.

El más grande los seis dominios de ARNr 23S, el dominio II, que representa la mayor parte de la parte posterior de la partícula, tiene tres protrusiones que se extienden hacia el lado de la interfase de la subunidad de la partícula (ver, Figura 4(F)). Uno de ellos (hélice 42 - 44) es la porción de ARN del tallo de L7/L12, que se sabe que interactúa con factores de elongación, no está bien ordenado en estos cristales. La protrusión del segundo dominio II es la hélice 38, que es el tallo más largo, no ramificado, en la partícula. Comienza en la parte posterior de la partícula, se dobla aproximadamente 90 grados y sobresale hacia la subunidad pequeña entre los dominios V y ARNr 5S. La tercera región, la hélice 32-35,1, apunta directamente hacia la subunidad pequeña y su extremo, el bucle del tallo/bucle 34, interactúa directamente con la subunidad ribosómica pequeña (Culver *et al.* (1999) *Science* 285: 2133-2135). Este bucle emerge en la interfase de la subunidad entre los dominios III y IV.

El dominio III es un dominio globular compacto que ocupa la región inferior izquierda de la subunidad en la vista en corona (ver, Figura 4(G)). Se asemeja a una estrella de cuatro puntas con el origen del dominio (tallo/bucle 48) y tallo/bucles 52, 57, y 58 formando las puntas. Los contactos más extensos del dominio III están con el dominio II, pero también interactúa con los dominios I, IV y VI. A diferencia de los otros dominios, el dominio III difícilmente interactúa con el dominio V; el único contacto es un contacto de van der Waals único que involucra una base individual de cada dominio.

El dominio IV representa la mayor parte de la superficie de la interfase de la subunidad 50S que se pone en contacto con la subunidad 30S (ver, Figura 4(H)). Forma un gran parche diagonal de superficie plana en ese lado de la subunidad, y conecta a los dominios III y V en la parte posterior de la partícula. Las hélices 67-71 son la característica más prominente del dominio IV, y forman el borde frontal de la hendidura del sitio activo, que es claramente visible a baja resolución (ver, Figura 2). Ésta es una de las pocas regiones del ARNr 23S que no está extensamente estabilizado por proteínas ribosómicas. La hélice 69 en el medio de esta cresta interactúa con el largo penúltimo tallo del ARNr 16S en la subunidad ribosómica pequeña y se puede ver como un divisor separando el ARNs unido al sitio A del ARNs unido al sitio P.

El dominio V, que se encuentra entremedio de los dominios IV y II en el medio de la subunidad, se sabe que está íntimamente involucrado en la actividad de la peptidiltransferasa del ribosoma. Estructuralmente el dominio puede ser dividido en tres regiones (ver, Figuras 4(I) y 4(J)). La primera comienza con la hélice 75 y forma finalmente el sitio de unión para la proteína L1. El segundo, que consiste en las hélices 80-88, forma el grueso de la región de la protuberancia central, y está soportado en la parte posterior por el ARNr 5S y el dominio II. La tercera región, que incluye las hélices 89-93, se extiende hacia el dominio VI y ayuda a estabilizar la región de unión del factor de elongación del ribosoma.

El dominio más pequeño en el ARNr 23S, el dominio VI, que forma una gran parte de la superficie de la subunidad inmediatamente por debajo del tallo L7/L12, se asemeja a una letra X con una barra horizontal en la parte inferior (ver, Figura 4(K)). Una región interesante de este dominio es el bucle sarcina-ricina (SRL) (tallo/bucle 95), cuya estructura ha sido ampliamente estudiada en forma aislada (Szewczak et al. (1995) J. Mol. Biol. 247: 81-98). El SRL es esencial para la unión del factor, y los ribosomas pueden ser inactivados por la escisión de enlaces covalentes simples en este bucle (Wool et al. (1992) TIBS 17: 266-269). Como lo sugieren los datos de protección del nucleótido, la principal ranura de este bucle está expuesta al solvente (Moazed et al. (1988) Nature 334: 362-364), y su conformación es estabilizada por proteínas y a través de la interacción con el dominio V que involucra dos bases en el lado menor de la ranura. Los nucleótidos involucrados son A 2699 y G 2700 en el dominio VI, y A 2566 y G 2567 en el dominio V.

El ARN ribosómico 5S, que es efectivamente el séptimo dominio de ARN en la subunidad, consiste en tres tallos que irradian hacia afuera desde una unión común denominada bucle A (ver, Figura 4(D)). Por contraste con lo que se ve en la estructura cristalina del fragmento 1 del ARNr 5S de *E. coli* (Correll et al. (1997) Cell 91: 705-712), el brazo 2/3 de la hélice de la molécula se apila en su brazo 4/5 de la hélice, no la hélice 1 (ver, Figura 4(L)). Este ordenamiento resulta de una conformación retorcida de residuos de bucle A que involucra dos triples bases apiladas. En efecto, desde el punto de vista de la estructura secundaria, el brazo 2,3 de la hélice del bucle A o ARNr 5S es bastante notable. En ningún otro lado en la subunidad hay una concentración mayor de apareamientos inusuales y de estructura secundaria de ARN enrollada.

6. Conservación de las secuencias e interacciones en 23S ARNr.

Si bien los ARNrs 23S/28S rARNs contienen muchas secuencias conservadas, también varían sustancialmente en la longitud de cadena. Los ARNrs 23S/28S más cortos se distinguen de sus homólogos más largos por el truncado de, o incluso la eliminación de, tallos/bucles enteros, y por comparación de las secuencias, se puede identificar una estructura mínima que es compartida por todos (Gerbi (1995) Ribosomal ARN: Structure, Evolution, Processing and Function in Protein Biosynthesis, *supra*, pp. 77-88). Las secuencias de expansión en el ARNr 23S de *H. marismortui*, es decir, las secuencias que contiene que son más grandes que el mínimo, se muestran en la Figura 5 en verde. Están ausentes en gran parte de la superficie de la interfase de la subunidad de la partícula, pero son abundantes en la superficie posterior, lejos de sus sitios activos. Esto es consistente con las observaciones de microscopía electrónica de baja resolución que sugieren que la región de la subunidad grande cuya estructura está más conservada es la superficie que interactúa con la subunidad pequeña (Dube et al. (1998) Structure 6: 389-399).

Hay dos clases de secuencias conservadas en ARNr 23S. Una contiene residuos concentrados en las regiones de sitios activos de la subunidad grande. La segunda clase consiste en secuencias mucho más cortas dispersadas a través de la partícula (Figura 5: secuencias rojas). La secuencia SRL en el dominio VI y el clúster de residuos conservados que pertenecen al dominio V, que están ubicados en la parte inferior de la hendidura de la peptidiltransferasa son miembros de la primera clase. Están conservados porque son esenciales para la unión de sustratos, la unión de factores y la actividad catalítica. La mayoría de los residuos en la segunda clase de residuos conservados están involucrados en las interacciones inter- e intradominio que estabilizan la estructura terciaria de ARNr 23S. Las adenosinas están representadas en forma desproporcionada en esta clase. La predominancia de A entre los residuos conservados en los ARNrs ha sido señalada en el pasado (Ware et al. (1983) Nucl. Acids. Res. 22: 7795-7817).

Además de su dependencia de los motivos A-dependientes, la estructura terciaria de los dominios de ARNr 23S y sus posiciones relativas están estabilizadas por elementos familiares de la estructura terciaria, tales como cremalleras de ARN y motivos receptores de tetrabucle/tetrabucle (Moore, P.B. (1999) Annu. Rev. Biochem. 68: 287-300), y en muchos lugares, los pares y triples de bases estabilizan las interacciones de las secuencias que pertenecen a los diferentes componentes de la estructura secundaria del ARNr 23S.

Es interesante que el ARNr 5S y el ARNr 23S no interactúan extensamente entre sí. Las pocas interacciones ARN/ARN que hay involucran los esqueletos del brazo 4/5 de la hélice o el ARNr 5S y el esqueleto de la hélice 38 de ARNr 23S. La mayoría de la energía libre y toda la especificidad o la unión de ARNr 5S a la subunidad ribosómica grande parece depender de sus extensas interacciones con proteínas que actúan como arcilla modeladora pegándola al resto del ribosoma.

7. Proteínas en la subunidad ribosómica 50S.

Las estructuras de veintisiete proteínas halladas en la subunidad ribosómica grande de *H. marismortui* (Tabla 2) han

sido determinadas. Veintiuna de estas estructuras de proteínas no han sido establecidas previamente por ningún homólogo, y las estructuras de las seis que tienen homólogos de estructura conocida han sido reconstruidos en el mapa de densidad electrónica usando sus secuencias de *H. marismortui*. Además, hay estructuras disponibles para homólogos de L1, L11 y L12 de *H. marismortui*, que no pueden ser visualizadas en el mapa de densidad electrónica de 2,4 Å de resolución. Sólo la estructura de L10 es desconocida aun entre las treinta y una proteínas conocidas hasta el presente.

No todas estas estructuras están completas. Por ejemplo, un dominio entero de L5 falta en la densidad electrónica, probablemente debido al desorden. L32e también es destacable a este respecto. Alrededor de veinte residuos de su extremo N no se ven en el mapa de densidad electrónica, y el mapa de densidad electrónica sugiere que su residuo C-terminal está unido en forma covalente con la mayoría de los extremos N de sus residuos visibles.

De las treinta proteínas ribosómicas de subunidad grande cuyas estructuras son conocidas, 17 son proteínas globulares, de carácter similar a las miles cuyas estructuras se encuentran en el Banco de Datos de Proteínas (Tabla 2). Las trece proteínas restantes tienen o bien cuerpos globulares con extensiones que sobresalen de ellas ("glb+ext") o están completamente extendidas ("ext"). Sus extensiones frecuentemente no tienen una terciaria evidente y en muchas regiones tampoco tienen una estructura secundaria (ver Figura 6). Estas extensiones pueden explicar por qué muchas proteínas ribosómicas han resistido la cristalización en el aislamiento. Las excepciones que prueban la regla son L2 y L4, las cuales son proteínas que pertenecen a la clase "glb+ext". La proteína L2 fue cristalizada y su estructura fue resuelta sólo después que se removieron sus extensiones (Nakagawa *et al.* (1999) *supra*), y una de las dos regiones de L4 que están extendidas en el ribosoma está desordenada en la estructura cristalina de la L4 intacta (Wahl *et al.* (2000) *supra*).

Excepto las proteínas L1, L7, L10 y L11, que forman las puntas de las dos protuberancias laterales, las proteínas de la subunidad 50S no se extienden significativamente más allá de la cubierta definida por el ARN (ver, Figura 7). Sus dominios globulares se encuentran en gran parte en el exterior de la partícula, frecuentemente alojada en espacios y hendiduras formadas por el plegado del ARN. Así, a diferencia de las proteínas en los virus esféricos, las proteínas de la subunidad ribosómica grande no forman una envuelta alrededor del ácido nucleico con el cual se asocian, y a diferencia de las proteínas en los nucleosomas, tampoco son rodeadas por ácido nucleico. En cambio, las proteínas actúan como un mortero que llena los espacios y grietas entre "ladrillos de ARN".

La distribución de proteínas en la superficie de la subunidad es casi uniforme, excepto por la hendidura del sitio activo y la superficie plana que interactúa con la subunidad 30S. En la vista en corona las proteínas se encuentran alrededor, en la periferia de la subunidad (ver, Figura 7(A)), pero cuando se observan desde el lado opuesto al sitio de unión de la subunidad 30S (el "lado posterior"), parecen formar un enrejado casi uniforme sobre toda su superficie (ver, Figura 7(B)). Similarmente, la superficie inferior de la subunidad, que incluye la salida del túnel de polipéptidos, está lleno de proteínas (ver, Figura 7(C)). En efecto, las 5 proteínas que rodean a la salida del túnel pueden tener un rol en la secreción de proteínas ya que son parte de la superficie orientada hacia la membrana y el translocón cuando se sintetizan la membrana y las proteínas segregadas.

Aunque la Figura 7 muestra cadenas de proteínas que desaparecen en el ribosoma interior, el grado en el cual las proteínas penetran el cuerpo de la partícula sólo puede ser apreciado completamente cuando se separa el ARN. El interior de la partícula no está libre de proteínas, pero es pobre en proteínas comparado con la superficie de la partícula. Los tentáculos extendidos del polipéptido, muchos de los cuales emanan de los dominios globulares en la superficie, penetran en el interior, llenando los espacios entre los elementos vecinos de la estructura secundaria del ARN (ver, Figura 8(E)). Las extrañas estructuras de estas extensiones se explican por sus interacciones con el ARN.

Aunque las estructuras no globulares, extendidas, son raras en la base de datos de proteínas, no son desconocidas. Los términos de proteínas extendidas frecuentemente forman contactos inter-proteínas, por ejemplo, en cápsides virales, presumiblemente adoptando estructuras fijas sólo después de la formación de la cápside. Las "colas" básicas de las histonas pueden comportarse de la misma manera cuando se forman los nucleosomas. Las secuencias N-terminales de las proteínas de la cápside frecuentemente están cargadas positivamente, y en las estructuras cristalinas de virus, la densidad electrónica para estas secuencias frecuentemente desaparece en el interior del virus en donde estas secuencias presumiblemente interactúan con ácido nucleico ordenado asimétricamente. Las interacciones observadas en el ribosoma podrían ser modelos útiles para estas interacciones virales.

Las interacciones de polipéptidos extendidos y ARN en la subunidad grande, que estabiliza su estructura de ácido nucleico masiva, da por resultado una maraña de ARN y proteína en el centro de la subunidad (ver, Figuras 8(A) y 8(B)). Es difícil imaginar un objeto como éste formándose a partir de sus componentes eficientemente de una manera que no sea una forma altamente ordenada. Los chaperones pueden ser requeridos para evitar la aglomeración de las regiones extendidas de estas proteínas, que probablemente estén desordenadas fuera del contexto provisto por el ARNr, y para manejar el plegado del ARNr.

8. Proteínas e interacciones de ARN.

Como la proteína penetra en la subunidad grande en un grado sorprendente, hay sólo unos pocos segmentos del ARNr 23S que no interactúan con la proteína. De los 2923 nucleótidos en el ARNr 23S, 1157 nucleótidos hacen por

lo menos un contacto de van der Waals con la proteína (ver, Figura 8(D)), y hay sólo diez secuencias más largas que veinte nucleótidos en las cuales ningún nucleótido entra en contacto con la proteína. La más larga de tales secuencias contiene cuarenta y siete nucleótidos, y es la parte del dominio IV que forma la cresta de la hendidura del sitio activo.

5 La medida de las interacciones entre el ARN y la proteína que ocurre cuando la subunidad grande se forma puede ser estimada cuantitativamente. Usando el algoritmo de Richards (Lee, B. et al. (1971) J. Mol. Biol. 55: 379-400) y una sonda de 1,7 Å de radio para computar las áreas de superficie accesibles, se puede mostrar que 180.000 Å² de superficie es tapada cuando la subunidad se forma a partir de sus componentes aislados, pero completamente estructurados. Esto es aproximadamente la mitad de su área de superficie total. El promedio es de
10 aproximadamente 6.000 Å² por proteína. Si bien ésta es una cantidad enorme comparada con la superficie tapada cuando se forma la mayoría de los oligómeros de las proteínas, debería reconocerse que el ensamblado del ribosoma tiene que ser acompañado por una gran pérdida en la entropía conformacional que no ocurre cuando la mayoría de las proteínas oligomeriza. Los extremos y bucles de la proteína extendida de las proteínas ribosómicas son casi ciertamente flexibles en aislamiento, y en ausencia de la proteína, el ARN es probablemente también
15 bastante flexible. Así, el ocultamiento de una gran cantidad de área de superficie puede ser requerido para proveer la energía necesaria para fijar las estructuras de estas moléculas.

Todas las proteínas en la partícula excepto la L12, interactúan directamente con el ARN y todas salvo siete de las treinta proteínas restantes interactúan con dos dominios de ARNr o más (Tabla 2). El "campeón" a este respecto es la L22, que es la única proteína que interactúa con las secuencias de ARN que pertenecen a los 6 dominios del ARNr 23S (ver, Figura 8(C)). Las interacciones mediadas por proteínas entre el ARNr 5S y el ARNr 23S son particularmente extensas. La proteína L18 une la hélice 1 y la hélice 2/3 o el ARNr 5S a la hélice 87 de ARNr 23S. La proteína L31e media una interacción entre la misma parte o el ARNr 5S y los dominios II y V. El bucle C está unido al dominio V por la proteína L5 y el bucle D está unido a los dominios II y V por la proteína L10e. Cualquiera sea otra función que desempeñen, es evidente que una función importante de estas proteínas es la estabilización de las orientaciones relativas de los dominios de ARN adyacentes. Varios también ayudan a asegurar las estructuras terciarias de los dominios con los cuales interactúan.

Como la mayoría de las proteínas ribosómicas interactúan con muchas secuencias de ARN y el número de proteínas excede en gran parte el número de dominios de ARN, difícilmente sea una sorpresa que cualquier dominio de ARNr interactúa con múltiples proteínas (Tabla 2). El dominio V, por ejemplo, interactúa con trece proteínas, algunas íntimamente y unas pocas de paso.

Es evidente que los experimentos de unión de oligonucleótidos sobre los que se basó la información acerca de las propiedades de unión de ARN de las proteínas ribosómicas han subestimado su potencial para interactuar con el ARN. El sitio de unión de ARN de alta afinidad identificado en una proteína por un experimento de ese tipo puede ser importante en efecto para el ensamblado del ribosoma, pero sus muchas interacciones más débiles con otras secuencias probablemente se pierdan, y éstas también pueden ser vitales para la estructura del ribosoma. La mayoría de las proteínas ribosómicas se unen en forma entrecruzada con el ARN y el entrecruzamiento es imposible sin múltiples interacciones. Consideraciones similares pueden aplicarse a las proteínas que son componentes de otras ribonucleoproteínas tales como el espliceosoma.

De las siete proteínas que interactúan sólo con un dominio, tres (L1, L10, L11) participan directamente en el proceso de síntesis de proteínas. En lugar de ser incluida en el ribosoma para asegurar que el ARN adopte la conformación adecuada, parece más apropiado ver al ARN como siendo estructurado para asegurar su colocación correcta. Otras tres (L24, L29, L18e) interactúan con varios elementos de la estructura secundaria dentro de los dominios a los cuales se unen y presumiblemente funcionan para estabilizar las estructuras terciarias de sus dominios. La última de las proteínas de dominio de ARN simples, L7ae, es un rompecabezas. Por un lado, no puede funcionar como una proteína estabilizadora de ARN porque interactúa sólo con una secuencia corta, individual, en el dominio I, y por otro lado, está lejos de los sitios funcionales importantes en la subunidad, el sitio de la peptidiltransferasa y el sitio de unión del factor. Está bastante cerca de la L1, sin embargo, lo que parece ser importante para la función del sitio E (Agrawal et al. (1999) J. Biol. Chem. 274: 8723-8729), y probablemente esté involucrada en esa actividad.

Si bien muchas proteínas ribosómicas interactúan primariamente con el ARN, algunas pocas interactúan significativamente con otras proteínas. La estructura más importante generada por las interacciones proteína-proteína es el clúster de proteína compuesto por L3, L6, L 14, L 19 y L24e que se encuentra cerca del sitio de unión del factor. La superficie de la proteína que proveen puede ser importante para las interacciones del factor.

La estructura presentada más arriba ilumina las fortalezas y las debilidades de las propuestas para los ensamblados complejos que dependen de la determinación de las estructuras de los componentes en aislamiento. Las estructuras de los dominios globulares de los homólogos de las proteínas en la subunidad ribosómica grande de *H. marismortui* son en gran parte los mismos que los de los dominios correspondientes en la subunidad intacta, aunque a veces se requieren ajustes en las posiciones de los dominios. En consecuencia, estas estructuras fueron muy útiles para localizar a las proteínas e interpretar los mapas de densidad electrónica de menor resolución. Sin embargo, por razones obvias, las estructuras de las colas y bucles extendidos de las proteínas ribosómicas no pueden ser determinadas en ausencia de los ARNs que les dan estructura, y la factibilidad de las estrategias que dependen de

producir complejos de ARN-proteína de bajo peso molecular que tengan todos los contactos de ARN requeridos para fijar las estructuras de tales proteínas parece remota. El ARN también es un problema. Si bien el bucle sarcina/ricina tiene una estructura casi igual en el aislamiento que la que tiene en el ribosoma, la estructura o el ARNr 5S en aislamiento difiere en algunos aspectos de lo que se observa en el ribosoma, y la estructura del bucle P aislado (Puglisi et al. (1997) Nat. Struct. Biol. 4: 775-778) no se asemeja a la estructura del bucle P en el ribosoma. Claramente una propuesta "genómica estructural" al ribosoma, que podría haber implicado determinar las estructuras de todas sus proteínas y todos los fragmentos de ARNr posibles, no hubiera dado resultado. Tampoco podría ser exitosa para otros conjuntos macromoleculares.

B. La base estructural de la actividad del ribosoma en la síntesis de unión peptídica

10 Análisis de las coordenadas atómicas comentadas en la sección IIA más arriba junto con las coordenadas atómicas adicionales de una subunidad ribosómica complejizada con varios análogos, refinados en forma similar, permiten un análisis de la función ribosómica. Por consiguiente, la presente invención se basa también en los cristales de la subunidad ribosómica 50S de *Haloarcula marismortui complejizada* o bien con el análogo del estado de transición de Yarus, el CCdA-p-puro, o con un análogo mini-hélice de un aminoacil-ARNr. La presente invención provee las estructuras de ambos complejos. Las coordenadas atómicas de la estructura de ambos complejos fueron depositadas el 26 de julio de 2000, en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) del Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) (Berman et al. (2000) Nucleic Acid Research 28: 235-242; <http://www.rcsb.org/pdb/>) con los números de acceso PDB ID: 1FFZ (complejo ribosoma/CCdA-p-puro 50S) y PDB ID: 1FG0 (ribosoma/análogo aa-ARNt 50S).

20 Como se comenta más abajo, las estructuras atómicas completas de la subunidad ribosómica grande y sus complejos con dos análogos de sustrato muestran que el ribosoma es una ribozima. Las estructuras atómicas completas también proveen información acerca de las propiedades catalíticas de su sitio activo de todo ARN. Ambos análogos del sustrato son contactados exclusivamente por los residuos de ARNr conservados del dominio V de ARNr 23S; no hay cadenas laterales de proteínas más cerca que aproximadamente 18 Å con respecto al enlace peptídico que es sintetizado. El mecanismo de la síntesis del enlace peptídico parece asemejarse al reverso del paso de desacilación en las serina proteasas, en donde la base de A2486 (A2451) en *E. coli* tiene el mismo rol de base general que His57 en la quimotripsina. El pKa inusual que A2486 tiene que poseer para realizar esta función probablemente se derive de su enlace de hidrógeno a G2482 (G2447) que interactúa con un fosfato incorporado que podría estabilizar los tautómeros inusuales de dos bases, que se requiere para la catálisis. El túnel de salida de polipéptidos se forma en gran parte por ARN pero tiene contribuciones significativas de las proteínas L22, L39 y L4 y su salida está rodeada por las proteínas L19, L22, L23a, L24 y L29.

35 El CCdA del análogo de Yarus se une al así llamado bucle P y por lo tanto tiene que estar en el sitio P. Sólo el CCA terminal del análogo aa-ARNt es visible, pero como interactúa apropiadamente con el bucle A (Kim et al. (1999) Molec. Cell 4: 859-864), tiene que estar en el sitio A. El grupo puromicina ocupa el mismo lugar en ambas estructuras, y no hay proteínas cerca de ese sitio. Por lo tanto, la actividad catalítica del sitio activo tiene que depender completamente del ARN. El N3 de A2486 (*E. coli* A2451) es el grupo titulable más cercano al enlace peptídico que está siendo sintetizado y probablemente funcione como una base general para facilitar el ataque nucleofílico por el grupo β-amino del sustrato del sitio A. Para que funcione en esta capacidad, el pKa de esta base tiene que ser alrededor de 5 unidades mayor que lo normal.

40 1. Estructuras de complejos de análogos del sustrato.

Para establecer cómo interactúan los sustratos en el sitio A y el sitio P de la subunidad grande, se usaron dos análogos del sustrato. Uno de los análogos, que fue diseñado para simular el tallo aceptor de un aa-ARNt y unirse al sitio A, era una horquilla de ARN de doce pares de bases con una extensión de cuatro nucleótidos aminoacilados en su extremo 3' (ver, Figura 9). La secuencia usada era la del tallo aceptor tyr de ARNr y está terminado con puromicina, ya que es ella misma un análogo de tirosil-A76. El segundo análogo usado era el análogo del estado de transición de Yarus, CCdA-p-puromicina. Como en el caso del análogo del sustrato del sitio A, se espera que la puromicina del inhibidor de Yarus se una en el sitio A, mientras que su parte CCdA debería unirse en el sitio P.

50 Las posiciones del inhibidor de Yarus y el análogo del tallo del aceptor de ARNr fueron determinadas embebiendo estas moléculas en cristales de la subunidad ribosómica 50S de *H. marismortui*, midiendo los datos de difracción a una resolución de 3,2 Å y calculando la diferencia de los mapas de densidad electrónica (Welch et al. (1997) Biochemistry 36: 6614-6623). También se calcularon los mapas de los complejos usando 2F_o(complejizado)-F_o(no complejizado) como coeficientes, para examinar las desviaciones en las posiciones de los residuos del ribosoma que ocurren cuando estos análogos se unen (ver, Figura 10(B) y Tabla 3).

Tabla 3

Estadística para la recolección de datos y escala				
Cristal	Nativo A	Nativo B	CcdAp-puro	Minihélice
Tiempo de embebido (horas)	-	-	24	24
Concentración de embebido (μM)	-	-	100	100
Longitud de onda (\AA)	1,0	1,0	1,0	1,00
Observaciones	1.571.171	1.344.877	2.590.726	2.712.813
Único	284.533	369.167	367.284	447.121
Redundancia	5.5	3.6	7.0	6.0
Límites de resolución (\AA)	70,0-3,2	70,0-3,0	70,0-3,0	70,0-2,8
(Bin de alta resolución)*	(3,26-3,20)	(3,05-3,00)	(3,23-3,17)	(3,08-3,02)
Completo	94,1 (96,0)	98,9 (99,3)	98,6 (99,9)	99,6 (100)
$1/\sigma$	14,6 (4,0)	10,8 (3,1)	11,0 (2,8)	10,7 (2,9)
$R_{\text{unión}}\dagger$	10,2 (40)	11,5 (38)	18,8 (84)	14,3 (72)
$R_{\text{iso}} \text{ Nativo A}\ddagger$	-	-	6,8 (20,8)	14,4 (25,2)
$R_{\text{iso}} \text{ Nativo B}\ddagger$	-	-	12,6 (27,4)	17,5 (31,0)
*Las estadísticas entre paréntesis son calculadas para el bin de alta resolución usado en los cálculos de los mapas, el que, como se indicó, era algunas veces de resolución más baja que el bin de alta resolución usado en la reducción de datos. $\dagger R_{\text{unión}} = \frac{\sum \sum I_{(h)} - \langle I_{(h)} \rangle }{\sum \sum I_{(h)}}$ en donde $I_{(h)}$ es la intensidad media después de la reflexión. $\ddagger R_{\text{iso}} = \frac{\sum F_{\text{PH}} - F_{\text{P}} }{\sum F_{\text{PH}}}$ en donde F_{PH} y F_{P} son las amplitudes del factor de estructura del cristal nativo y embebido, respectivamente.				

Un modelo para todo el inhibidor de Yarus podría ser ajustado en el mapa de densidad de diferencia (ver Figura 10(A)), y el mapa de la densidad electrónica del complejo muestra el N3 de A2486 (2451) dentro de una distancia del enlace de hidrógeno de un oxígeno que no forma puente de la fosforamida (ver Figura 10(B)). Los dos C del inhibidor, que corresponden a C74 y C75 del peptidil-ARNt, tienen las bases de Watson-Crick apareadas con G2285 (2252) y G2284 (2251) en el bucle P, respectivamente (ver Figura 11 (A)). La interacción de C74-G2285 (2252) fue predicha por los resultados de Noller y colaboradores (Noller et al. (1992) Science 256: 1416-1419). El dA, que corresponde a A76 de un ARNt en el sitio P, no tiene las bases apareadas, sino más bien está apilado en la ribosa de A2486 y se une por un enlace de hidrógeno al 2'OH del nucleótido A2485 (ver Figura 12(B)).

Sólo la parte de la CC-puromicina del análogo del tallo aceptor de la mini-hélice mostró una densidad electrónica ordenada en su mapa de densidad electrónica de diferencia (ver Figura 10(C)). El C75 del tallo aceptor CCA tiene las bases de Watson-Crick apareadas con G2588 (2553) del bucle A, mientras que el C74 está más desordenado y no tiene las bases apareadas, sino que parece apilarse sobre una base del ribosoma. El dimetil A del inhibidor del sitio A puromicina está posicionado en forma idéntica al dimetil A del inhibidor de Yarus. Además, el dimetil A de la puromicina, que es el equivalente A76 de un ARNt del sitio A, interactúa con el bucle A en forma similar a la que el A76 del CCA del sitio P interactúa con el bucle P (ver Figura 11(B)).

Lo más notable de los diversos cambios conformacionales en el ribosoma inducidos por la unión del análogo del estado de transición, es el ordenamiento de la base A2637 (2602), que está desordenado en la enzima no ligada (ver Figura 11(B)). Se posiciona entre el CCA unido en el sitio A y el CCA unido en el sitio P. La base de U2620 (2585) también se mueve de tal modo que puede realizar un enlace de hidrógeno con el 2' hidroxilo de la ribosa del A76 en el sitio A, y U2619 y G2618 se desvían para permitir que el A76 sea posicionado. Se observan desviaciones más pequeñas de las posiciones en las posiciones de A2486, cuyo N3 está cerca del oxígeno que no forma puente del fosfato, y uno de los residuos G con los que interactúa, G2102 (2482).

2. Ubicación y composición química del sitio de la peptidiltransferasa.

Los inhibidores están unidos a un sitio hecho completamente de ARNr 23S sin proteínas cerca, probando que el ribosoma es una ribozima. Tanto el inhibidor de Yarus como el análogo de aa-ARNt del sitio A se unen a la subunidad grande en la parte inferior de una hendidura grande y profunda a la entrada al túnel de salida de polipéptidos de 100 Å de longitud que corre a través de la parte posterior de la subunidad (ver Figura 12). Este sitio está rodeado por nucleótidos que pertenecen al bucle central del dominio V de ARNr 23S, el "bucle de peptidiltransferasa". Los nucleótidos de las porciones de hebra simple de este bucle realizan el acercamiento más cercano al fosfato que simula el intermediario del carbón tetrahédrico. En general, las hélices que se extienden desde el bucle de la peptidiltransferasa en 2 diagramas de estructura secundaria de ARNr 23S también se extienden apartándose del sitio activo en la estructura terciaria (ver Figura 13). Aunque hay 13 proteínas que interactúan con el dominio V (ver Figura 14(A)), no hay proteínas globulares en la cercanía del inhibidor. Los polipéptidos más cercanos son las extensiones no globulares de varias proteínas (L2, L3, L4, L10e) que penetran profundamente en el dominio V y se acercan al sitio activo (ver Figura 14(B)). Estas extensiones llenan muchos de los huecos entre las hélices de ARNr del dominio V, neutralizan la carga del esqueleto de fosfato, y presumiblemente estabilizan la estructura del dominio y su asociación con otras regiones del ARNr. Sin embargo, ninguno de sus átomos de la cadena lateral está más cerca que aproximadamente 18 Å al fósforo del grupo fosfato del inhibidor, lo que marca el sitio en donde se forman los enlaces peptídicos. Además, el análogo del sustrato está completamente encerrado en una cavidad del ARNr que está tan estrechamente empaquetada que no hay posibilidad de que un péptido no identificado pudiera pasar cerca (ver Figura 15). Así, la entidad catalítica en el ribosoma tiene que ser ARNr.

Dos de las proteínas con extremos o bucles largos que penetran en el andamiaje del ARNr del dominio V son proteínas que no podían ser excluidas previamente de su participación en la reacción de la peptidiltransferasa L2 y L3 (Noller (1991) Ann. Rev. Biochem. 60: 191-227). Noller y colegas (Noller *et al.* (1992) *supra*) hallaron que bajo condiciones que evitan la desnaturalización del ARNr, la amplia digestión de las subunidades 50S de *Thermus thermophilus* con proteasas seguido de la extracción con fenol y otros agentes que interrumpen las interacciones proteína-ARN no removieron varios péptidos de la subunidad que eran menos de 10.000 en peso molecular. La estructura torna evidente porqué estos fragmentos de proteínas eran particularmente resistentes a los tratamientos con proteasa. Si bien el tratamiento con proteasa podía digerir los dominios de la proteína globular en la superficie de la subunidad grande, no podía remover los extremos o bucles largos que penetran profundamente en el ARNr 23S debido a que son secuestrados dentro del ARNr y así protegidos de la escisión, independientemente de los dominios globulares.

3. Sitio activo de la peptidiltransferasa.

El ARNr que rodea los análogos del sustrato está estrechamente empaquetado, muy similar a la región del sitio activo de una enzima proteína y los nucleótidos en contacto con el inhibidor son más grandes que 95% conservados en los tres reinos de la vida (ver Figura 15). Así, está claro que el ribosoma es una ribozima, ¿pero qué le da al ARNr su poder catalítico?

Sin pretender quedar limitado por la teoría, el residuo que más probablemente esté involucrado en la catálisis, presumiblemente como una base general, es el A2486, cuyo N3 está a aproximadamente 3 Å del oxígeno de la fosforamida del inhibidor de Yarus que es el análogo del oxígeno del carbonilo de un enlace peptídico naciente y a aproximadamente 4 Å de la amida que corresponde al nitrógeno de la amida del enlace peptídico que está siendo sintetizado. Comúnmente, el pKa del N1 del monofosfato de adenosina está a aproximadamente 3,5 y el de su N3 está quizás 2 unidades de pH más abajo (Saenger (1984) Principles of Nucleic Acid Structure, (C.R. Cantor, eds.), Springer Advanced Texts in Chemistry, Springer-Verlag, Nueva York, NY), y para que el A2486 funcione como una base general, su pKa tendría que ser elevado a 7 o más. La estructura del cristal propiamente dicho sugiere que su pKa es, en efecto, bastante inusual. El N3 de A2486 sólo se puede unir por un enlace de hidrógeno al oxígeno del fosfato, como se observó, si éste (o el oxígeno del fosfato) es protonado. La distancia entre estos dos átomos es de aproximadamente 3 Å indicando que un enlace de hidrógeno existe realmente entre ellos. Como el cristal se encuentra a pH 5,8, esto implica que el pKa del N3 es mayor que 6. Muth y Strobel han medido el pKa del A correspondiente en ARNr 23S de *E. coli* examinando su reactividad dimetil sulfato como una función del pH y han concluido que es 7,6, aunque no pueden estar seguros a partir de sus experimentos si el pKa que midieron es el del N3 o el del N1 (Muth *et al.* (2000) Science 289: 947-950). Como no hay otro grupo funcional de ARNr tituable disponible, más cercano que aproximadamente 7 Å al enlace peptídico naciente, no hay otro grupo disponible que funcione como una base general.

Hay varias características del medio ambiente de A2486 (2451) que podrían afectar su pKa. El pKa del N3 de A2486 (2451) puede aumentarse significativamente en parte por un mecanismo de reenvío de carga, análogo al que ocurre en el sitio activo de las serina proteasas, con el fosfato de A2485 (2450) incorporado realizando una función similar a la del carboxilato incorporado de Asp102 de quimotripsina. El mapa de densidad electrónica de 2.4 Å experimental establece en forma no ambigua las interacciones del enlace de hidrógeno en esta región más crítica del sitio activo (ver Figura 16(A)). El N6 de A2486 interactúa con los 06 átomos de G2482 (2447) y G2102 (2061) (ver Figura 16(B)). El N2 de G2482 también está interactuando con un oxígeno que no forma puente del grupo fosfato de A2485 (2450) que esté entre el total de los 3 grupos fosfato más inaccesibles al solvente (826, 1497 y 2485) en la subunidad ribosómica grande para los cuales no vemos ningún contraión neutralizante en el mapa de 2,4 Å de

resolución. La densidad débil que puede corresponder a una molécula de agua está unida por enlace de hidrógeno al otro oxígeno que no forma puente. No se observa un contraíón neutralizante en esta estructura. El fosfato incorporado de A2485 podría sustraer el protón del N2 exocíclico de G2482 para neutralizar su carga negativa depositada energéticamente desfavorable. Esto a su vez estabilizaría el imino tautómero, de otro modo raro, de esa base. La interacción de un imino de G2482 con A2486 igualmente puede estabilizar el tautómero imino de A2486 que resultaría en una carga negativa en su N3 en donde se desprotonaba (ver Figura 16(C)). De esta manera una parte de la carga electrostática negativa que se originaba en el fosfato depositado de A2485 podría ser reenviada al N3 de A2486, aumentando de esta manera su pKa.

Una segunda característica del medio ambiente del sitio catalítico que puede afectar su estabilidad, estado tautomérico y distribución de la carga electrostática es un catión monovalente unido. Un ion potasio o un ion sodio interactúa con el O6 de G2482 y G2102 así como también con otras tres bases. Su identidad como un ion potasio es establecida por su continuación observada y por un experimento independiente que muestra que un ion de rubidio puede unirse a este sitio. El ion monovalente podría estabilizar también los tautómeros no estándar, pero su influencia esperada sobre el pKa de A2486 es menos obvia. Experimentos bioquímicos anteriores han mostrado la importancia del potasio para la actividad de peptidiltransferasa (Monro (1967) *supra*; Maden *et al.* (1968) *supra*) y este sitio de unión podría ser responsable de tal efecto.

También podría ser el caso de que la estabilización de un tautómero imino por un fosfato incorporado explique el pKa mayor esperado de una citosina catalítica en el sitio activo de la ribozima del virus delta de la hepatitis (Ferred'Amare *et al.* (1998) *Nature* 395: 567-574; Naharo *et al.* (2000) *Science* 287: 1493-1497). En este caso, se observa que un fosfato del esqueleto, cuya accesibilidad al solvente es similar a la del A2485 en el ribosoma, se une por un enlace de hidrógeno al N4 de C, y la forma protonada del imino tautómero imino de ese C neutralizaría el fosfato, promoviendo la función de su N3 como un ácido general (Naharo *et al.* (2000) *supra*).

4. Mecanismo catalítico de la formación del enlace peptídico.

La proximidad del N3 de A2486 (2451) al enlace peptídico que está siendo sintetizado y la naturaleza de la reacción catalizada sugiere un mecanismo químico de la síntesis de péptidos que es análoga al reverso del paso de desacilación vista en las serina proteasas durante la hidrólisis de péptidos (Blow *et al.* (1969) *Nature* 221: 337-340; Steitz *et al.* (1982) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 11: 419-444). En ese mecanismo, la forma básica de His57 sustrae un protón del grupo β-amino del producto peptídico ya que ataque el acil-Ser195. La formación del intermediario de carbono del carbonilo tetrahédrico es estabilizado por interacción del oxianión formado con amidas del esqueleto (el "agujero oxianión"); His57 transporta el protón adquirido del β-NH₂ a Ser195 cuando el intermediario tetrahédrico se descompone.

El residuo A2486 (2451) parece ser análogo a His57 en quimotripsina y que el peptidil-ARNr es análogo al acil-Ser195. Así, el N3 de A2486, con su pKa muy elevado, sustrae un protón del grupo β-amino del aminoacil-ARNt unido al sitio A que facilita el ataque nucleofílico de ese grupo amino sobre el carbono del carbonilo que acila el 3' OH del ARNt en el sitio P (ver Figura 17(A)). Por contraste con las serina proteasas, sin embargo, el oxianión del intermediario tetrahédrico está cerca del N3 protonado de A2486 (A2451) más que estar próximo a un sitio de unión de oxianión separado. Así, podría ser que el N3 protonado de A2486 estabiliza la formación del oxianión por enlace de hidrógeno con éste, como se observa en el complejo inhibidor de Yarus (ver Figura 17(B)). El N3 de A2486 podría transferir entonces subsiguientemente su protón al 3' hidroxilo del ARNt unido al sitio P, que es liberado a medida que el péptido se desvía al ARNt unido al sitio A (ver Figura 17(C)).

Una cuestión adicional es ¿cómo se evita la hidrólisis catalizada del peptidil ARNt en el sitio P antes de la liberación del siguiente aa-ARNt apropiado al sitio A? De este complejo parece que no se excluiría agua del acceso al enlace peptídico al ARNt del sitio P, si el sitio A estuviera vacante. Un problema análogo fue comentado por Koshland en los años 60 (Koshland, Jr. (1963) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28: 473-489), quien teorizó porque la hexoquinasa no hidroliza el ATP en ausencia de glucosa, ya que el agua debería unirse perfectamente bien al sitio de unión usado por el 6-hidroxilo de la glucosa. La respuesta propuesta fue ajuste inducido, es decir, la hexoquinasa no es catalíticamente competente hasta que la glucosa se une y produce un cambio conformacional que orienta a los sustratos y los grupos catalíticos en forma óptima. Esto parece realmente ser el caso (Bennett, Jr. *et al.* (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4848-4852). Similarmente, podría ser que el A2486 catalítico y/o el sustrato peptídico no están orientados adecuadamente o que el sitio de unión para el grupo β-NH₂ está bloqueado por una base de ribosoma reorientada en ausencia de aa-ARNt en el sitio A. La base de U2620 parece estar cerca de A2486 en la estructura libre de ligando, y puede servir como el tapón apropiado que evita la hidrólisis espontánea del peptidil-ARNt.

Así, parece que esta enzima de ARN usa los mismos principios de catálisis que una enzima proteína. Primero se logra un gran aumento catalítico precisamente orientando los dos reactivos, el aNH₂ de aminoacil-ARNt del sitio A y el carbono del carbonilo del peptidil-ARNt del sitio P. Esto se puede lograr, en parte, por las interacciones de los extremos CCA de los ARNt del sitio A y del sitio P con el bucle A y el bucle P, respectivamente. En segundo lugar, la catálisis ácido-base y la estabilización del estado de transición se logran por un grupo funcional enzimático (A2486 (2451) en este caso) cuyas propiedades químicas son alteradas apropiadamente por el medio ambiente del sitio activo. En tercer lugar, se pueden usar principios químicos similares por ARN y enzimas proteínas para alterar los

pKa de los grupos funcionales. Un carboxilato incorporado de Asp 102 que actúa a través de His57 altera la nucleofilicidad de Ser195 en la quimotripsina (Blow *et al.* (1969) *supra*). En el ribosoma un fosfato inaccesible al solvente que puede actuar a través de G2482 (2447) altera la nucleofilicidad del N3 de A2486 (2451). Podría ser que las moléculas de ARN "aprendieron" cómo usar los principios químicos de catálisis significativamente antes de que lo hicieran las moléculas de proteínas.

5. Unión a ARNt.

Si bien no es posible unir las moléculas de ARNt o bien al sitio A o al sitio P en estos cristales por razones estéricas, es posible colocar las moléculas de ARNt de los sitios A, P y E en la subunidad ribosómica grande en la misma orientación relativa que observaron Cate *et al.* en su estudio cristalográfico del ribosoma 70S de *Thermus aquaticus*. Las coordenadas de las tres moléculas de ARNt en las posiciones relativas vistas en el ribosoma 70S pueden ser acopladas en la subunidad ribosómica grande de *Haloarcula marismortu* de una manera que evita los choques estéricos y coloca a los tallos aceptores de los ARNt de los sitios A y P cerca de las posiciones de los CCAs que hemos observado unidos al bucle A y al bucle P (ver Figura 18). Aunque los nucleótidos C74 y C75 fueron modelados en una conformación diferente en el mapa del ribosoma de 7,8 Å, los residuos C74 de los CCA en los sitios A y P pueden estar conectados al residuo 72 de los ARNt de los sitios A y P acoplados a través de un residuo modelado 73, y parece que las moléculas de ARNt se ajustan bien en la superficie de la subunidad. Inesperadamente, este modelado coloca a las moléculas de ARNt unidas a los sitios E, P y A en una proximidad estrecha con las tres proteínas ribosómicas. Las proteínas L5 y L10e están cerca de los ARNts en el sitio P y el sitio A. Como esta dos proteínas también interactúa con el ARNr 5S, esta observación plantea la posibilidad de que el ARNr 5S y algunas de sus proteínas asociadas podría ayudar a estabilizar el posicionamiento de los ARNt unidos al ribosoma y es consistente con el hecho de que el ARNr 5S aumenta la actividad ribosómica, pero no es absolutamente esencial para ello (Moore, Ribosomal ARN & Structure, Evolution, Processing and Function in Protein Biosynthesis (1996), *supra*, pp. 199-236). La proteína L44e parece interactuar con el ARNt del sitio E y puede contribuir a la actividad del sitio E. De acuerdo con este experimento de acople, el ARNt del sitio A interactúa con el bucle del tallo altamente conservado 2502-2518 (2467-2483) que junto con la L10e forma una gran superficie cóncava que pone en contacto el ARNt en el tallo T, utilizando exactamente el mismo sitio de unión explotado por EF-Tu (Gutell *et al.* (2000) *supra*).

El examen de las relaciones entre los CCAs unidos en los sitios A y P y los ARNr a los cuales están conectados así como también sus interacciones con el ribosoma también llevan a alguna comprensión de la translocación. Inmediatamente después de la formación del nuevo enlace peptídico y la desacilación del ARNt del sitio P, se sabe que el extremo aceptor del ARNt del sitio P se mueve al lado E y que el del ARNr del sitio A se mueve al sitio P (Blobel *et al.* (1970) *J. Cell. Biol.* 45: 130-145). El modelado aproximado de las 3 moléculas de ARNt en la subunidad grande sugiere algunas posibles contribuciones a este proceso. En primer lugar, hay dos pares de bases entre el ARN del sitio P y el bucle P y sólo uno entre el sitio A y el bucle A. El moverse del sitio A al sitio P aumenta el apareamiento de bases, aunque tiene que haber una atracción concomitante del ARNt del sitio P desacilado a un sitio E. Además, los CCAs unidos a los bucles A y P están relacionados por una rotación de 180°, mientras que los ARNt a los cuales están unidos no. Así, las relaciones de los CCAs con los tallos del aceptor no pueden ser iguales en ambos sitios y pueden no ser igualmente estables. Si la conformación del ARNt del sitio A es menos estable, entonces mover un ARNt del sitio A al sitio P podría ser favorecido energéticamente.

6. Túnel de salida de polipéptidos.

Parece muy probable de la estructura que todos los polipéptidos nacientes pasan a través del túnel de salida de polipéptidos antes de emerger del ribosoma, ya que parece no haber otra salida. Podemos contestar ahora dos importantes cuestiones sobre el funcionamiento del túnel de salida de polipéptidos: (1) ¿Por qué las proteínas nacientes no se pegan a sus paredes? El Teflon tiene la maravillosa propiedad de no pegarse a las proteínas desnaturalizadas del huevo, por lo tanto ¿cómo ha logrado el ribosoma una superficie similar que no se pega para las proteínas desnaturalizadas que tiene que pasar a través del túnel? (2) ¿Se pliegan las proteínas en algún grado en el túnel dando al ribosoma una función tipo chaperón?

La longitud del túnel del lado de la síntesis de péptidos a su salida es de aproximadamente 100 Å, bastante consistente con la longitud del polipéptido naciente que es protegido de la escisión proteolítica por el ribosoma (Moazed *et al.* (1989) *Nature* 342:142) y la longitud mínima requerida para el reconocimiento de anticuerpos a la salida (Picking *et al.* (1992) *Biochemistry* 31: 2368-2375). El túnel es en gran parte recto, excepto por una curva 20 a 35 Å del centro de la peptidiltransferasa (ver Figura 19). Su diámetro varía de aproximadamente 20 Å en su punto más ancho a un punto estrecho de aproximadamente 10 Å en el comienzo y en una posición 28 Å de la salida del túnel con un diámetro promedio de aproximadamente 15 Å. Como el orificio más pequeño a través del cual el producto del polipéptido tiene que pasar, sólo apenas aloja el diámetro de una hélice β , parece poco probable que el plegado significativo de la proteína más allá de la formación de la hélice β pudiera ocurrir dentro del ribosoma.

La mayor parte de la superficie del túnel está formada por los dominios I - V del ARNr 23S, pero también realizan contribuciones significativas las regiones no globulares de las proteínas L22, L4 y L39 que no sólo llenan algunos de los huecos en el andamiaje del ARN, sino también forman porciones significativas de la pared del túnel (ver Figura

19). El mayor contribuyente de proteína a la superficie del túnel es L22, cuyo largo bucle de horquilla β se encuentra entre los segmentos de ARN de los dominios I a IV y es aproximadamente paralelo con el eje del túnel. A diferencia de otras proteínas del túnel, la proteína L39 no tiene un dominio globular en la superficie de la partícula y está casi completamente depositada en los dominios I y III debajo de la proteína L23. Es interesante que los nucleótidos del ARNr 23S que forman la pared del túnel son predominantemente de bucles en la estructura secundaria del ARNr 23S (ver Figura 19). A medida que progresa a través del túnel desde el sitio activo, un polipéptido naciente encuentra primero el dominio V seguido 20 Å más allá por los dominios II y IV y las proteínas L4 y L22. La última mitad del túnel está formada por los dominios I y III y la proteína L39e.

La parte más estrecha del túnel está formada por las proteínas L22 y L4 que se aproximan al túnel desde lados opuestos que forman lo que parece ser una abertura con puerta (gated) (ver Figura 19C). La función de esta constricción, si la tiene, no es evidente. Puede ser el lugar en donde se siente la naturaleza de la cadena naciente y la información transmitida a la superficie de la partícula, quizás a través de L22 o L4. La horquilla β de L22 en el sitio de este orificio y el ARNr 23S que interactúa con éste están altamente conservados; su porción globular está ubicada adyacente a la salida del túnel en la superficie que tiene que enfrentar el translocón durante la secreción de proteínas (ver Figura 19).

El carácter “no pegajoso” de la pared del túnel tiene que reflejar una falta de complementariedad estructural y de polaridad con respecto a cualquier secuencia de proteína o conformación que encuentra. La superficie del túnel es en gran parte hidrófila e incluye grupos de enlaces de hidrógeno de bases, fosfatos del esqueleto y cadenas laterales de proteínas polares (ver Figura 19). Si bien hay muchos grupos hidrófobos (azúcares, bases, cadenas laterales de proteínas) que también enfrentan el túnel, no hay parches de superficie hidrófoba suficientemente grandes como para formar un sitio de unión significativo para las secuencias hidrófobas en el polipéptido naciente. Como el túnel tiene aproximadamente 20 Å de diámetro y está lleno con agua y el polipéptido recién sintetizado se puede mover presumiblemente en forma libre, la unión de un péptido a la pared del túnel daría por resultado una gran pérdida de entropía que tendría que ser compensada por una gran superficie de interacción complementaria que es más grande que 700 Å (Chothia et al. (1975) Nature 256: 705-708). Similarmente, si bien las cadenas laterales de Arg y Lys del péptido naciente pueden interactuar realmente con los fosfatos expuestos en el túnel, el grado de complementariedad estructural y la energía de unión neta obtenida después de desplazar contraiones unidos tiene que ser demasiado pequeña para superar la gran entropía desfavorable de inmovilización que resultaría de la unión del péptido. Así, aunque el túnel del ribosoma está hecho principalmente de ARN, la naturaleza de su superficie es reminiscente de la superficie interior de la chaperonina, GroEL (Xu et al. (1998) J. Struct. Biol. 124:129-141) en su conformación no ligante. Sólo en la conformación que expone una gran superficie hidrófoba la GroEL une una proteína desnaturalizada.

Hay seis proteínas (L19, L22, L23, L24, L29 y L31e) ubicadas a la salida del túnel, que enfrentan al translocón sobre el cual el ribosoma se acopla durante la secreción de proteínas. Hay evidencia de que el ribosoma une al translocón aun después de una amplia digestión de su proteína por la proteasa, implicando que la interacción entre el translocón y el ribosoma es mediada por el ARN. La proximidad de estas proteínas al translocón, sin embargo, nos lleva a pensar qué rol, si es que tiene, podría tener en el proceso de secreción de proteínas. Datos recientes del laboratorio Dobberstein muestran que el dominio N-terminal de SRP54, la proteína G de la partícula de reconocimiento de señales involucrada en la unión del péptido señal, puede entrecruzarse con las proteínas ribosómicas L23 y L29. Estas dos proteínas se encuentran adyacentes entre sí y en la salida del túnel (ver Figura 19).

7. Evolución.

La evolución *in vitro* de los oligonucleótidos de ARN ha producido pequeñas moléculas de ARN que pueden unir moléculas como el inhibidor de Yarus efectivamente o catalizar la reacción de la peptidiltransferasa (Zhaug et al. (1998) Chem. Biol. 5: 539-553; Welch et al. (1997) *supra*). La secuencia y la estructura secundaria de uno de estos ARN seleccionados es reminiscente del bucle de la peptidiltransferasa en el dominio V de ARNr 23S (Zhaug et al. (1998) *supra*). La similitud más importante es una secuencia de cinco nucleótidos que es idéntica a una secuencia en el dominio V que incluye el A2486, G2482 catalítico y el fosfato depositado de A2485. Notablemente, todos los grupos involucrados en el sistema de reenvío de la carga propuesta para activar el A2486 en el ribosoma, están presentes en la ribozima seleccionada *in vitro*. Así, aunque el contexto estructural circundante probablemente sea diferente, parece plausible que esta ribozima desarrollada artificialmente use los mismos mecanismos que el ribosoma para desviar el pKa de una adenina y los use igualmente como una base para la síntesis de péptidos. Un segundo ARN (Welch et al. (1997) *supra*) contiene un bucle de 12 nucleótidos que incluye una secuencia de 9 bases idéntica a la hallada en la misma región del bucle de la peptidiltransferasa.

Las notables similitudes entre las secuencias que contienen los elementos catalíticos clave hallados en el sitio activo de la peptidiltransferasa del ribosoma y las secuencias de los ARN seleccionados *in vitro* que tienen actividades relacionadas hace evidente que la aparición de un pequeño dominio de ARN capaz de catalizar la peptidiltransferasa era un primer paso plausible en la evolución de la síntesis de proteínas en el ribosoma. Los primeros péptidos sintetizados por esta enzima que sintetiza el péptido primordial podrían haber sido polímeros o copolímeros aleatorios, y puede haber funcionado con sustratos tan simples como un CCA aminoacilado. Los péptidos básicos de los tipos observados para formar las extensiones no globulares que se coplegan con el ARNr 23S podrían haber

estado entre los primeros péptidos sintetizados que fueron funcionalmente útiles. Tales péptidos pueden haber mejorado la estabilidad del protoribosoma y otras ribozimas tempranas como los péptidos más sofisticados del ribosoma actual parecen hacer.

C. Estructura atómica de la subunidad ribosómica grande a 2.4 Å de resolución, refinamiento completo

5 La estructura tridimensional de la subunidad ribosómica grande de *Haloarcula marismortui* ha sido refinada ahora completamente a 2,4 Å de resolución. El modelo incluye 2876 nucleótidos de ARN, 3701 aminoácidos de 28 proteínas ribosómicas, 117 iones de magnesio, 88 cationes monovalentes, y 7898 moléculas de agua. Muchas de sus proteínas consisten en un dominio globular expuesto en superficie y una o más extensiones no globulares, básicas, que están depositadas en el ARNr. La mitad de éstas incluyen motivos comunes en las proteínas no ribosómicas incluyendo, por ejemplo: dominios RRM, cilindros tipo SH3 y dedos de zinc. Las proteínas que tienen similitud de secuencias y estructurales significativas, tales como L15 y L18e, realizan interacciones con ARNr esencialmente idénticas.

Más particularmente, la subunidad 50S de *H. marismortui* ha sido reconstruida completamente y refinada por vueltas sucesivas de minimización de gradiente de energía y el refinamiento del factor B usando CNS (Brünger *et al.* (1998) *supra*). Las proteínas ribosómicas y el ARNr fueron reconstruidos completamente usando el programa de software "O" (Jones, T.A. *et al.* (1991) *Acta Crystallogr.* A46: 110-119) con mapas de densidad electrónica 2Fo-Fc antes del modelado de solvente y iones metálicos. Los errores de modelado en las proteínas fueron identificados usando PROCHECK (Laskowski *et al.* (1993) *J. Appl. Cryst.* 26: 283-291) y por inspección de mapas Fo-Fc. Los mapas de diferencia también ayudaron en la identificación de errores en el ARNr, asociado más frecuentemente con pliegues de azúcar. En el proceso, se realizaron algunos ajustes en las conformaciones de aminoácidos, el registro de secuencias y en las secuencias propiamente dichas. Los cambios de secuencia realizados estaban limitados en gran parte a L10e, L15e, y L37Ae, las únicas tres proteínas del *H. marismortui* 50S que no habían sido secuenciadas directamente. Además, se agregaron cincuenta y un aminoácidos al modelo descrito en la sección IIA con cuarenta y cuatro de estos provenientes de L10 en la base del tallo de L7/L12 y L39e que reviste una porción de la pared del túnel de salida de polipéptidos. Se realizaron menos ajustes a la estructura del ARNr. Se modelaron y refinaron cuarenta y nueve nuevos nucleótidos, principalmente en las hélices 43 y 44 en el dominio II de rARN 23S. Además, el pliegue de azúcar o conformación alrededor del enlace glicosídico fue ajustado para algunos nucleótidos. El proceso de refinamiento fue monitoreado por la calidad de los mapas de densidad electrónica calculados usando fases derivadas del modelo así como también valores R / R_{libre}. El modelo completamente refinado incluye ahora 2876 nucleótidos de ARN, 3701 aminoácidos, 210 iones metálicos y 7898 moléculas de agua. El modelo se refina a un R/R_{libre} de 18,9% / 22,3% y tiene una geometría excelente (Tabla 4).

El modelado de solvente comenzó con la generación de una lista de iones de magnesio posibles obtenida por una selección pico automática usando CNS. Se seleccionaron los picos mayores que 3,5σ en los mapas Fo-Fc posicionados dentro de la distancia de coordinación de la esfera interior del magnesio de 1,9 - 2,1 Å de los átomos N u O. La lista resultante fue examinada manualmente y sólo se seleccionaron los picos que presentaban una geometría de coordinación octahédrica clara como magnesio.

Los cationes monovalentes fueron identificados en base a diferencias de isomorfos entre los cristales embebidos en rubidio y los cristales nativos de la subunidad 50S de *H. marismortui*. Como los cristales nativos fueron estabilizados en presencia de 1,6M de NaCl, estos sitios fueron modelados y refinados inicialmente como Na⁺¹. El refinamiento de estos sitios como K⁺¹ casi siempre dio por resultado factores de temperatura inusualmente alta, con dos excepciones en donde hemos modelado K⁺¹. La mayoría de los sitios monovalentes en la subunidad 50S parecen estar ocupados por Na⁺¹ en nuestros cristales, sin embargo, estos sitios probablemente sean ocupados por K⁺¹ *in vivo*.

Se seleccionaron aguas como picos mayores que 3,5σ en los mapas de densidad electrónica Fo-Fc y entre 2,5 y 3,3 Å de los átomos O o N. Se usaron valores del factor B Individuales para evaluar la asignación de moléculas de agua. Un número de aguas refinadas a factores B disminuyen más significativamente que el ARN circundante y los átomos de proteínas. En muchos casos se halló que estos picos eran iones metálicos o iones cloruro. Un pequeño número de moléculas de agua de factor B bajo fue retenido en el modelo final porque no podían ser asignados en forma no ambigua como otras especies. Como resultado de la adición de iones metálicos y moléculas de agua el modelo final contiene ahora 98, 547 átomos no de hidrógeno. Las estadísticas de refinamiento y modelo para la subunidad ribosómica grande se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4

Estadísticas de refinamiento y modelo para la subunidad 50S de *H. marismortui*

Grupo espacial	C222 ₁
a = 211,66Å, b = 299,67Å, c = 573,77Å	
Total de átomos no de hidrógeno	98.542
Átomos de ARN	61.617
Átomos de proteínas	28.800
Moléculas de agua	7.893
Iones de magnesio	117
Iones de potasio	2
Iones de sodio	86
Iones cloruro	22
Iones de cadmio	5
Estadísticas de refinamiento:	
Rango de resolución	15,0 - 2,4 Å
Número de reflexiones usadas en el refinamiento	623.525
Número de reflexiones para validación cruzada	6.187
R _{trabajo}	18,9%
R _{libre}	22,3%
σ _a un error de coordenada (validación cruzada)	0,35Å (0,43Å)
error de coordenada Luzzati (validación cruzada)	0,29Å (0,35Å)
Desviaciones del ideal:	
r.m.s.d. de las longitudes de unión	0,0052Å
r.m.s.d. de los ángulos de unión	1,13°
r.m.s.d. de dihédricos	15,7°
r.m.s.d. de impropios	2,12°
Estadísticas de proteínas del gráfico de Ramachandran:	
Residuos en regiones más favorecidas	2704 (86,6%)
Residuos en regiones permitidas adicionales	379 (12,1%)
Residuos en regiones permitidas generosamente	27 (0,9%)
Residuos en regiones rechazadas	13 (0,4%)
Estadísticas del factor B promedio (Å²):	
Todos los átomos (alto /bajo)	44,3 (10,1/133,7)
ARNr	41,2 (11,78/125,0)
Proteínas	49,7 (13,9 / 92,5)
Aguas	41,89 (9,58/115,4)

El refinamiento también ha permitido un modelado adicional de L10, L39e, y el sitio de unión de L11 en el ARNr 23S. Además, se ha descubierto que algunos motivos, por ejemplo, topologías RRM, cilindros tipo SH3 y dedos de zinc son comunes en las proteínas 50S y cada uno reconoce el ARNr de muchas maneras diferentes. Las proteínas que tienen una homología tridimensional significativa, sin embargo, tal como L15 y L18e así como también L18 y S11, realizan interacciones esencialmente idénticas en ARNr. También son evidentes homologías estructurales adicionales entre las proteínas 50S y las proteínas no ribosómicas. Las superficies expuestas a solvente de estos dominios de proteínas globulares son ricos en residuos de aspartato y glutamato, mientras que las extensiones irregulares de las proteínas penetran en el núcleo de ARN del ribosoma. Estas extensiones frecuentemente están altamente conservadas, y su abundancia de residuos de arginina, lisina y glicina es importante para su función. Colectivamente, los resultados muestran conexiones evolutivas entre muchas proteínas ribosómicas e ilustra que las interacciones entre proteína-ARN en el ribosoma, aunque en gran parte idiosincráticas, comparten algunos principios comunes.

D. Sitios de unión de antibióticos

Además de los estudios estructurales precedentes, la estructura de la subunidad ribosómica grande de *H. marismortui* ha sido determinada complejizada con cada uno de nueve antibióticos diferentes. Más específicamente, cristales de la subunidad ribosómica grande de *H. marismortui* han sido embebidos con uno de los siguientes antibióticos: anisomicina, blastidina, carbomicina A, tilosina, esparsomicina, virginiamicina M, espiramicina, azitromicina, linezólido o eritromicina. La estructura de la subunidad ribosómica grande complejizada con cada antibiótico se resolvió luego en base a los datos de difracción de rayos X generados para cada cristal.

Brevemente, una pequeña cantidad de una solución de antibiótico concentrada se agregó a un cristal de subunidad grande suspendido en solución de estabilización e incubado durante varias horas. Después del congelamiento y otros procedimientos usados normalmente para preparar tales cristales para uso experimental, se recogieron los datos de difracción de rayos X de los cristales que contenían antibiótico. Como los cristales eran isomorfos con respecto a aquellos de los cuales se deriva la estructura descrita más arriba, las fases obtenidas para el cristal nativo fueron combinadas con las intensidades de difracción obtenidas del cristal embebido en antibiótico para obtener una estructura para este último. La posición del antibiótico en el cristal al cual se unió se revela con mayor claridad en los mapas de densidad electrónica de diferencia, que son mapas de densidad electrónica computados usando las fases a las que se hizo referencia recién y las amplitudes obtenidas sustrayendo las amplitudes de los cristales que no contienen antibiótico de las amplitudes (en escala adecuada) de aquellos que contienen antibiótico. Usando los métodos precedentes, fue posible determinar las coordenadas atómicas que muestran la relación espacial entre antibióticos particulares y sus sitios de unión dentro de la subunidad ribosómica grande. Se considera que se pueden usar métodos similares para resolver la estructura de otros antibióticos complejizada con la subunidad ribosómica grande.

Las coordenadas atómicas de la subunidad ribosómica grande complejizada con anisomicina están indicadas en una tabla en un disco compacto, Disco N.º 1 bajo el nombre de archivo anisomicina.pdb, un conjunto más refinado de éstas está representado en una tabla en un disco compacto, Disco N.º 1 bajo el nombre de archivo ANISOMYC.PDB, y depositado en el Banco de Datos de Proteínas del RCSB con el número de acceso PDB ID: 1K73. Además, la Figura 20 muestra la relación espacial entre el antibiótico anisomicina y la subunidad ribosómica grande.

Las coordenadas atómicas de la subunidad ribosómica grande complejizada con blastidina se indican en una tabla en el disco compacto Disco N.º 1 bajo el nombre de archivo blastidin.pdb, un conjunto más refinado de éstas está representado en una tabla en un disco compacto, Disco N.º 1, bajo el nombre de archivo BLASTICI.PDB, y depositado en el Banco de Datos de Proteínas del RCSB con el número de acceso PDB ID: 1KC8. La Figura 21 muestra la relación espacial entre el antibiótico blastidina y la subunidad ribosómica grande. Para orientación, la Figura 21 también incluye un sustrato para el sitio.

Las coordenadas atómicas de la subunidad ribosómica grande complejizada con carbomicina A se indican en una tabla en el disco compacto, Disco N.º 1 bajo el nombre de archivo carbomycin.pdb, un conjunto más refinado de éstas está representado en una tabla en un disco compacto, Disco N.º 1 bajo el nombre de archivo CARBOMYC.PDB, y depositado en el Banco de Datos de Proteínas del RCSB con el número de acceso PDB ID: 1K8A. La Figura 22 muestra la relación espacial entre el antibiótico carbomicina A y la subunidad ribosómica grande. La Figura 22 también muestra una porción del túnel de salida de polipéptidos.

Las coordenadas atómicas de la subunidad ribosómica grande complejizada con tilosina se indican en una tabla en un disco compacto, Disco N.º 1 bajo el nombre de archivo tylosin.pdb, un conjunto más refinado de éstas está representado en una tabla en un disco compacto, Disco N.º 1, bajo el nombre de archivo TYLOSIN.PDB, y depositado en el Banco de Datos de Proteínas del RCSB con el número de acceso PDB ID: 1K9M. La Figura 22 muestra la relación espacial entre el antibiótico tilosina y la subunidad ribosómica grande. La Figura 22 también muestra una porción del túnel de salida de polipéptidos.

Las coordenadas atómicas de la subunidad ribosómica grande complejizada con esparsomicina se indican en una tabla en un disco compacto, Disco N.º 1, bajo el nombre de archivo sparsomycin.pdb, un conjunto más refinado de

éstas está representado en una tabla en un disco compacto, Disco N.º 1, bajo el nombre de archivo SPARSOMY.PDB. La Figura 23 muestra la relación espacial entre el antibiótico esparsomicina y la subunidad ribosómica grande. Para orientación, la Figura 23 también muestra un sustrato para el sitio P.

5 Las coordenadas atómicas de la subunidad ribosómica grande complejizada con virginiamicina M están indicados en una tabla en un disco compacto, Disco N.º 1, bajo el nombre de archivo virginiamycin.pdb, un conjunto más refinado de éstas está representado en una tabla en un disco compacto, Disco N.º 1, bajo el nombre de archivo VIRGINIA.PDB. La Figura 24 muestra la relación espacial entre los antibióticos virginiamicina M así como también carbomicina A, y la subunidad ribosómica grande.

10 Las coordenadas atómicas de la subunidad ribosómica grande complejizada con espiramicina están indicadas en una tabla en un disco compacto, Disco N.º 1, bajo el nombre de archivo spiramycin.pdb, un conjunto más refinado de éstas está representado en una tabla en un disco compacto, Disco N.º 1, bajo el nombre de archivo SPIRAMYC.PDB, y depositado en el Banco de Datos de Proteínas del RCSB con el número de acceso PDB ID: 1KD1. La Figura 25 muestra la relación espacial entre el antibiótico espiramicina y la subunidad ribosómica grande.

15 Las coordenadas atómicas de la subunidad ribosómica grande complejizada con azitromicina están indicadas en una tabla en un disco compacto, Disco N.º 1, bajo el nombre de archivo AZITHROM.PDB, un conjunto más refinado de éstas está representado en una tabla en un disco compacto, Disco 1, bajo el nombre de archivo azithromycin.pdb. La Figura 26 muestra la relación espacial entre el antibiótico azitromicina y la subunidad ribosómica grande.

20 Las coordenadas atómicas de la subunidad ribosómica grande complejizada con linezólido están indicadas en una tabla en un disco compacto, Disco N.º 1, bajo el nombre de archivo LINEZOLI.PDB, un conjunto más refinado de éstas está representado en una tabla en un disco compacto, Disco N.º 1, bajo el nombre de archivo linezolid.pdb. La Figura 27 muestra la relación espacial entre el antibiótico linezólido y la subunidad ribosómica grande.

25 Las coordenadas atómicas de la subunidad ribosómica grande complejizada con eritromicina están indicadas en una tabla en un disco compacto, Disco N.º 1, bajo el nombre de archivo erythromycin.pdb. La Figura 28 muestra la relación espacial entre el antibiótico eritromicina y la subunidad ribosómica grande.

30 La Figura 29 muestra las orientaciones espaciales de varios antibióticos, a saber, blasticidina, anisomicina, virginiamicina M y carbomicina A, cuando se unen a sus sitios de unión de antibióticos respectivos dentro de la subunidad ribosómica grande. A los fines de orientar al lector, las posiciones del sitio P, el sitio A y el túnel de salida de polipéptidos se muestran en la Figura 29. Como resulta evidente, estos antibióticos se unen a, o se ponen en contacto con, ubicaciones específicas dentro de la subunidad ribosómica grande para interrumpir la biosíntesis de proteínas. Por ejemplo, parece que blasticidina se une a la subunidad ribosómica grande en la cercanía del sitio P; anisomicina y virginiamicina se unen a la subunidad ribosómica grande en la cercanía del sitio A; y carbomicina, espiramicina, tilosina, azitromicina y eritromicina (macrólido 5), todas se unen a la subunidad ribosómica grande en la cercanía del túnel de salida de polipéptidos adyacente al sitio de la peptidiltransferasa.

35 De la Figura 29, resulta evidente que el experto en el arte puede identificar algunas porciones de cada antibiótico que contactan regiones en la subunidad ribosómica grande. Conociendo su relación espacial una con respecto a la otra, el experto en el arte puede generar una molécula de antibiótico híbrida que comprende una porción de un primer antibiótico de molde y una porción de un segundo antibiótico de molde diferente. Las dos porciones pueden estar unidas por un ligador químico de modo de mantener la orientación espacial de una porción con respecto a la otra porción. Como resultado, el antibiótico híbrido puede unir simultáneamente cada una de las regiones de la subunidad ribosómica unidas típicamente por cada antibiótico de molde. El diseño y el testeado de tales moléculas se comenta con más detalles más abajo.

45 La Figura 30(A) muestra la molécula de tilosina unida dentro del túnel de salida de polipéptidos. La Figura 30(A) muestra una porción ampliada de la subunidad ribosómica grande con el antibiótico tilosina unido en la parte superior del túnel de salida de polipéptidos adyacente al sitio de la peptidiltransferasa. Las Figuras 30(B) y 30(C) son vistas que muestran cada mitad de una subunidad ribosómica grande cortada a lo largo del túnel de salida de polipéptidos y se proveen para orientar al lector para mostrar el sitio de unión de tilosina con relación a la unidad ribosómica grande como un todo. La Figura 30(A) también muestra dos cavidades definidas por la pared del túnel de salida del polipéptido y están indicadas como "cavidad 1" y "cavidad 2". Además, la Figura 30(A) también muestra un bolsillo de unión de disacáridos. La dirección en la cual las cadenas del polipéptido recién sintetizado sale del ribosoma a través del túnel de salida de polipéptidos se indica con una flecha.

E. Técnicas experimentales que explotan los datos de difracción de rayos X

55 En base al modelo de difracción de rayos Xn obtenido del ensamblado de las moléculas o átomos en un sólido cristalino, la densidad electrónica de ese sólido puede ser reconstruida usando herramientas bien conocidas por los expertos en el arte de las técnicas de cristalografía y difracción de rayos X. Información de fases adicional extraída o bien de los datos de difracción y disponibles en la literatura publicada, y/o de experimentos suplementarios, pueden ser usados luego para completar la reconstrucción.

Para conceptos básicos y procedimientos de recolección, análisis y utilización de los datos de difracción de rayos X para la construcción de densidades electrónicas ver, por ejemplo, Campbell et al. (1984) *Biological Spectroscopy*, The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., (Menlo Park, CA); Cantor et al. (1980) *Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the study of biological structure and function*, W.H. Freeman y Co., San Francisco, CA; A.T. Brunger (1993) *X-PLOR Versión 3.1: A system for X-ray crystallography and NMR*, Yale Univ. Pr., (New Haven, CT); M.M. Woolfson (1997) *An Introduction to X-ray Crystallography*, Cambridge Univ. Pr., (Cambridge, UK); J. Drenth (1999) *Principles of Protein X-ray Crystallography* (Springer Advanced Texts in Chemistry), Springer Verlag; Berlín; Tsirelson et al. (1996) *Electronic Density and Bonding in Crystals: Principles, Theory and X-ray Diffraction Experiments in Solid State Physics and Chemistry*, Inst. of Physics Pub.; Patente U.S. No. 5.942.428; Patente U.S. No. 6.037.117; Patente U.S. No. 5.200.910 y Patente U.S. No. 5.365.456 ("Method for Modeling the Electronic Density of a Crystal").

Un modelo molecular puede ser construido luego progresivamente usando la información de densidad electrónica experimental y refinado ulteriormente contra los datos de difracción de rayos X dando por resultado una estructura molecular correcta del sólido.

15 F. Determinación estructural de otras subunidades ribosómicas grandes

Se entiende que el experto en el arte, cuando se le proveen las coordenadas atómicas de una primera macromolécula, puede usar esta información para determinar de manera rápida y fácil la estructura tridimensional de una macromolécula diferente pero estructuralmente relacionada. Por ejemplo, las coordenadas atómicas que definen la subunidad ribosómica grande de *H. marismortui* se pueden usar para determinar la estructura de la subunidad ribosómica grande de otras especies o bien como una subunidad aislada, complejizada con la subunidad pequeña, o bien de ésta complejizada con ligandos funcionalmente importantes, por ejemplo: aminoacil ARNt; varios factores de síntesis de proteínas, tales como el factor de elongación G, el factor de elongación Tu, el factor de terminación o el factor de reciclado, en sus estados conformacionales GTP y GDP; y los inhibidores de la síntesis de proteínas, por ejemplo, antibióticos. Además, las coordenadas de la subunidad de *H. marismortui* también se pueden usar para resolver las estructuras de los complejos ribosómicos con componentes de la maquinaria de secreción de proteínas, por ejemplo, la partícula de reconocimiento de señales, y el translocón.

Si el cristal que está siendo examinado contiene una macromolécula de estructura desconocida y no se encuentra disponible información adicional, pueden requerirse experimentos adicionales algunas veces para determinar las fases relevantes de la macromolécula. Estos estudios pueden requerir frecuentemente mucho tiempo y tienen un éxito incierto (Blundell *et al.* (1976) *supra*). Sin embargo, cuando se encuentra disponible información adicional, por ejemplo, información estructural y/o cristalográfica, para moléculas relacionadas de alguna manera con la macromolécula de interés, entonces el proceso de resolver la estructura de la molécula de interés es una tarea no tan difícil y que no consume tanto tiempo.

Por consiguiente, el experto en el arte puede usar información recogida de la estructura resuelta previamente para desarrollar un modelo tridimensional de una nueva molécula de interés. Además, el experto en el arte puede usar una variedad de propuestas para explicar la estructura tridimensional de la nueva molécula. Las propuestas pueden depender de que los cristales de la molécula de interés se encuentren disponibles y/o de que la molécula de interés tenga un homólogo cuya estructura ya haya sido determinada.

En una propuesta, si la molécula de interés forma cristales que son isomorfos, es decir, que tienen las mismas dimensiones de unidad de celda y grupo espacial que la molécula relacionada cuya estructura ha sido determinada, entonces las fases y/o las coordenadas para la molécula relacionada pueden ser combinadas directamente con amplitudes recién observadas para obtener mapas de densidad electrónica y, en consecuencia, coordenadas atómicas de la molécula de interés. Los mapas y/o coordenadas atómicas resultantes pueden ser refinados luego usando técnicas de refinamiento estándar conocidos en el arte. En otra propuesta, si la molécula de interés está relacionada con otra molécula de estructura tridimensional conocida, pero cristaliza en una unidad de celda diferente con diferente simetría, el experto en el arte puede usar una técnica conocida como reemplazo molecular para obtener fases útiles de las coordenadas de la molécula cuya estructura es conocida (Blundell *et al.* (1976) *supra*). Esta propuesta según se informó fue usada en la determinación de la estructura de la subunidad 50S de *Deinococcus radiodurans* (Harms J. et al., *Cell* 107 (5):679-88; Schlunzen F. et al., (2001) *Nature* 413(6858):814-21). Estas fases pueden ser usadas luego para generar un mapa de densidad electrónica y/o coordenadas atómicas para la molécula de interés. En otra propuesta, si no hay cristales disponibles para la molécula de interés pero es homóloga a otra molécula cuya estructura tridimensional es conocida, el experto en el arte puede usar un proceso conocido como modelado de homología para producir un modelo tridimensional de la molécula de interés. Se considera que otras propuestas pueden ser útiles para derivar un modelo tridimensional de una molécula de interés. Por consiguiente, la información concerniente a los cristales y/o coordenadas atómicas de una molécula pueden facilitar en gran parte la determinación de las estructuras de las moléculas relacionadas.

El método de reemplazo molecular, desarrollado inicialmente por Rossmann y Blow en los años 1960, se usa ahora rutinariamente para establecer las estructuras cristalinas de las macromoléculas de estructuras desconocidas usando la estructura de una molécula homóloga, o una en un estado de ligadura diferente (M.G. Rossmann, ed. "The Molecular Replacement Methods", *Int. Sci. Rev. J.* No. 13, Gordon & Breach, Nueva York, NY (1972); Eaton

Lattman, "Use of Rotation and Translation Functions," H. W. Wyckoff, C.H. W. Hist. (S.N. Timasheff, ed.) *Methods in Enzymology*, 115: 55-77 (1985)). Para un ejemplo de la aplicación del reemplazo molecular, ver, por ejemplo, Rice, P.A. & Steitz, T.A. (1994) *EMBO J.* 13: 1514-24.

5 En el reemplazo molecular, la estructura tridimensional de la molécula conocida está posicionada dentro de la
 10 unidad de celda del nuevo cristal hallando la orientación y la posición que provee la mejor concordancia entre las
 amplitudes de difracción observadas y las calculadas de las coordenadas de la subunidad posicionada. De este
 modelado, se pueden derivar fases aproximadas para el cristal desconocido. Para posicionar una estructura
 conocida en las celdas unitarias de una estructura desconocida, pero relacionada, tienen que determinarse tres
 15 ángulos de rotación y tres traducciones relacionadas con el origen de la unidad de celda. La investigación de la
 rotación es llevada a cabo buscando una concordancia entre la función de Patterson de la búsqueda y las
 estructuras objetivo en función de su orientación relativa (la función de rotación). X-PLOR (Brünger et al. (1987)
Science 235: 458-460; CNS (Crystallography & NMR System, Brünger et al., (1998) *Acta Cryst. Sect. D* 54: 905-
 921), y AMORE: an Automatic Package for Molecular Replacement (Navaza, J. (1994) *Acta Cryst. Sect. A*, 50: 157-
 163) son programas de computación que pueden ejecutar las búsquedas de la función de rotación y traducción. Una
 20 vez que se conoce la orientación de una molécula de prueba, tiene que hallarse la posición de la molécula usando
 una búsqueda traduccional. Una vez que la estructura conocida ha sido posicionada en la unidad de celda de las
 moléculas desconocidas, se pueden calcular las fases para los datos de difracción observados a partir de las
 coordenadas atómicas de los átomos estructuralmente relacionados de las moléculas conocidas. Usando las fases
 calculadas y los datos de difracción de rayos X para la molécula desconocida, el experto en el arte puede generar un
 mapa de densidad electrónica y/o coordenadas atómicas de la molécula de interés.

A modo de ejemplo, se considera que un modelo tridimensional de una subunidad ribosómica distinta de la derivada
 de *H. marismortui* puede ser generado a través del reemplazo molecular. En este método, las estructuras de
 subunidad de *H. marismortui* están posicionadas dentro de la unidad de celda del nuevo cristal hallando la
 25 orientación y posición que provee la mejor concordancia entre las amplitudes de difracción observadas y aquellas
 calculadas de las coordenadas de la subunidad posicionada. Un mapa de densidad electrónica de partida calculado
 usando $2F_{\text{hkl}}(\text{observado}) - F_{\text{hkl}}(\text{calculado})$, en donde $F(\text{observado})$ son las amplitudes de difracción que han sido
 medidas de cristales de la estructura desconocida, y $F(\text{calculado})$ son las amplitudes de difracción calculadas de la
 estructura de subunidad de *H. marismortui* posicionada. El refinamiento del modelo inicial se puede realizar ya que
 es estándar en el campo de la cristalografía macromolecular.

30 La estructura 50S de *H. marismortui* también se puede usar para establecer la estructura de un ribosoma 70S o un
 ribosoma 50S para el cual se ha calculado un mapa de densidad electrónica, a una resolución que de otro modo
 sería muy baja para ser interpretada, mientras que un mapa de resolución 5 no podría ser interpretado en términos
 atómicos *de novo*, un modelo atómico plausible puede ser construido reajustando la estructura 50S de *H.*
marismortui a un mapa de resolución más baja (por ejemplo, 4,5 h a 8 h). Este reajuste puede ser combinado con
 35 modelado de homología para obtener un modelo tridimensional de un ribosoma o una subunidad ribosómica de una
 especie diferente. Se considera que se pueden usar procedimientos similares para determinar la estructura de la
 subunidad 60S eucariótica y/o un ribosoma eucariótico.

En general, el éxito de un reemplazo molecular para resolver estructuras depende de la fracción de las estructuras
 que están relacionadas y su grado de identidad. Por ejemplo, si aproximadamente 50% o más de la estructura
 40 muestra una diferencia r.m.s. entre los átomos correspondientes en el rango de aproximadamente 2 h o menos, la
 estructura conocida puede ser usada exitosamente para resolver la estructura desconocida.

Modelado de homología, también conocido como modelado comparativo o modelado basado en el conocimiento, se
 puede usar para generar un modelo tridimensional para una molécula en base a la estructura conocida de los
 homólogos. En general, el procedimiento puede comprender uno o más de los siguientes pasos: alineamiento de la
 45 secuencia de un aminoácido o un ácido nucleico de una molécula desconocida contra la secuencia de un
 aminoácido o ácido nucleico de una molécula cuya estructura ha sido determinada previamente; identificar las
 regiones estructuralmente conservadas y estructuralmente variables; generar las coordenadas atómicas para los
 residuos núcleo (estructuralmente conservados) de la estructura desconocida de aquellos de las estructuras
 desconocidas; generar conformaciones para los otros residuos (estructuralmente variables) en la estructura
 50 desconocida; construir conformaciones de cadenas laterales; y refinar y/o evaluar la estructura desconocida.

A modo de ejemplo, como las secuencias del nucleótido de todos los ARN de subunidad 50S conocidos pueden ser
 alineadas unas con relación a las otras y a los ARNr 23S y 5S de *H. marismortui*, es posible construir modelos de las
 estructuras de otros ARNr ribosómicos 50S, particularmente en las regiones del túnel y sitios activos, usando la
 estructura de *H. marismortui*. Igualmente, las proteínas homólogas también pueden ser modeladas usando
 55 metodologías similares. Los métodos útiles para el análisis de secuencias de ARN comparativo son conocidos en el
 arte e incluyen métodos visuales y métodos de modelo de números, así como también métodos que emplean las
 estadísticas de chi-cuadrado, algoritmos filogenéticos o algoritmos empíricos. Descripciones de algunos de los
 métodos antes mencionados se encuentran disponibles, por ejemplo, en <http://www.ARN.icmb.utexas.edu/>; Guttell
 (1996), "Comparative Sequence Analysis and the Structure of 16S and 23S rRNA", *Ribosomal RNA. Structure,*
 60 *Evolution, Processing, and Function in Protein Biosynthesis*, (Dahlberg A. y Zimmerman B., eds.) CRC Press. Boca
 Ratón, pp. 111-128; Guttell et al. (1993) *Nucl. Acid Res.* 21: 3055 - 3074; Schnare et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 256: 701-

719. Los métodos de inspección visual particularmente útiles incluyen la comparación de una posición particular en un diagrama de estructura secundaria de *H. marismortui* con los residuos ubicados en la posición análoga en un diagrama de estructura secundaria de *E. coli*. Un programa de software que es particularmente útil en el modelado de homología incluye XALIGN (Wishart, D. et al., (1994) *Cabios* 10: 687-88). Ver también, Patente U.S. No. 5.884.230.

Para modelar el ARNr de una especie nueva, se pueden reemplazar bases del ARNr de *H. marismortui*, usando un programa de gráficos de computación tal como "O" (Jones et al., (1991) *Acta Cryst. Sect. A*, 47: 110-119), por aquellos del ARNr homólogo, en donde difieren. En muchos, si no en la mayoría, de los casos será apropiada la misma orientación de la base. Las inserciones y deleciones pueden ser más difíciles y especulativas, pero el ARNr que forma el sitio de la peptidiltransferasa y la porción del túnel más cercana a éste está altamente conservada esencialmente sin inserciones y deleciones. Se puede realizar el modelado de homología basado en la web automatizado usando, por ejemplo, los programas de computación SWISS-MODEL disponibles a través de Glaxo Wellcome Experimental Research en Ginebra, Suiza, y WHATIF disponible en los servidores de EMBL.

Para otras descripciones de modelado de homología, ver, por ejemplo, Gutell R.R. (1996), *supra*; Gutell R.R., et al. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21: 3055-3074; Schnare et al. (1996) *J. Mol. Biol.*, 256: 701-719; Blundell et al. (1987) *Nature* 326: 347-352; Fetrow y Bryant (1993) *Bio/Technology* 11:479-484; Greer (1991) *Methods in Enzymology* 202: 239-252; y Johnson et al. (1994) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 29:1-68. Un ejemplo de modelado de homología se puede hallar, por ejemplo, en Szklarz G.D. (1997) *Life Sci.* 61: 2507-2520.

Como se comentó más arriba, la subunidad ribosómica grande de procariontes y eucariotas, y las mitocondrias eucarióticas se encuentran estructuralmente conservados. Las secuencias de aminoácidos de la subunidad ribosómica grande de procariontes y eucariotas pueden estar alineadas debido a la conservación evolutiva de los residuos de aminoácidos que son importantes para la estructura tridimensional, la naturaleza y la forma de los sitios de unión para los sustratos y el sitio catalítico. Esta similitud en la secuencia de aminoácidos de la subunidad ribosómica grande homóloga permite la construcción de modelos, a través del modelado de homología, para las moléculas cuyas estructuras cristalinas no han sido resueltas.

Las nuevas estructuras de ribosoma o de subunidad ribosómica grande determinadas usando los cristales y/o coordenadas atómicas de *H. marismortui* pueden ser usadas luego para el diseño de fármacos basados en la estructura usando una o más de las propuestas descritas más abajo. Esta información puede ser usada luego para diseñar moléculas que se unen selectivamente e interrumpen la síntesis de proteínas en los ribosomas de los patógenos mientras dejan a los ribosomas de un huésped relativamente no afectados.

G. Diseño racional de fármacos

1. Introducción

Se considera que las coordenadas atómicas que definen una subunidad ribosómica grande de interés, ya sea derivada de uno o más de cristalografía de rayos X, modelado molecular, modelado de homología o reemplazo molecular, pueden ser usadas en el diseño racional de fármacos (RDD) para diseñar una nueva molécula de interés, por ejemplo, nuevos moduladores (por ejemplo, inductores, miméticos o inhibidores) de la función ribosómica. Además, se considera que usando los principios divulgados en la presente, el experto en el arte puede diseñar, realizar, testear, refinar y usar nuevos inhibidores de la síntesis de proteínas específicamente creados por ingeniería genética para reducir, interrumpir, u otra cosa, o inhibir la función ribosómica en un organismo o especie de interés. Por ejemplo, usando los principios comentados en la presente, el experto en el arte puede crear por ingeniería genética nuevas moléculas que tienen como objetivo específicamente e inhiben la función ribosómica en un patógeno, por ejemplo, un organismo procarionte particular, mientras preserva la función ribosómica en un huésped, por ejemplo, un organismo eucariótico, específicamente un mamífero, y más específicamente, un ser humano. Como resultado, las coordenadas atómicas provistas y comentadas en la presente permiten al experto en el arte diseñar nuevos antibióticos que pueden matar a algunos organismos patógenos, mientras que tienen poca o ninguna toxicidad en el receptor previsto, por ejemplo, un ser humano.

Se considera que el RDD usando coordenadas atómicas de la subunidad ribosómica grande puede ser facilitado más rápidamente a través de un diseño de fármacos asistido por ordenador (CADD) usando hardware y software conocido de ordenador convencional y usado en el arte. Las moléculas candidato pueden ser diseñadas *de novo* o pueden ser diseñadas como una versión modificada de una molécula ya existente, por ejemplo, un antibiótico preexistente, usando metodologías convencionales. Una vez diseñadas, las moléculas candidato pueden ser sintetizadas usando metodologías estándar conocidas y usadas en el arte. Después de la síntesis, las moléculas candidato pueden ser rastreadas con respecto a la bioactividad, por ejemplo, por su capacidad para reducir o inhibir la función ribosómica, su capacidad para interactuar con, o unirse a un ribosoma, o una subunidad ribosómica. Basado en parte en estos resultados, las moléculas candidato pueden ser refinadas iterativamente usando uno o más de los pasos precedentes para producir una molécula más conveniente con una actividad biológica deseada. Las moléculas resultantes pueden ser útiles para el tratamiento, la inhibición o la prevención de las actividades biológicas de los organismos objeto, matando de este modo al organismo o impidiendo su crecimiento. Alternativamente, las moléculas resultantes pueden ser útiles para el tratamiento, la inhibición o la prevención de

infecciones microbianas en cualquier organismo, particularmente en animales, más particularmente en seres humanos.

En resumen, las herramientas y metodologías provistas en el presente invención se pueden usar para identificar y/o diseñar moléculas que se unen y/o interactúan de modo conveniente con los ribosomas y las subunidades ribosómicas. Básicamente, los procedimientos utilizan un proceso iterativo por el cual las moléculas son sintetizadas, testeadas y caracterizadas. Se pueden diseñar nuevas moléculas en base a la información ganada en el testeo y la caracterización de las moléculas iniciales y luego tales moléculas recién identificadas pueden ser testeadas y caracterizadas. Esta serie de procesos puede ser repetida tantas veces como sea necesario para obtener moléculas con propiedades de unión y/o actividades biológicas deseables. Los métodos para la identificación de las moléculas candidato se comentan con más detalles más abajo.

2. Identificación de las moléculas candidato

Se considera que el diseño de las moléculas candidato de interés puede ser facilitado por procedimientos de modelado convencionales de bola y barra. Sin embargo, en vista del tamaño y la complejidad de la subunidad ribosómica grande, se considera que la capacidad para diseñar moléculas candidato puede ser mejorada significativamente usando protocolos de diseño y modelado basados en computación.

a. Modelado molecular.

Se considera que el diseño de las moléculas candidato, como se comenta en detalle más abajo, puede ser facilitado usando ordenadores o terminales de trabajo convencionales, disponibles comercialmente, por ejemplo, de Silicon Graphics Inc. y Sun Microsystems, que operan, por ejemplo, sistemas operativos basados en UNIX, Windows NT o IBM OS/2, y capaces de operar programas de computación convencionales para el modelado molecular y el diseño racional de fármacos.

Se entiende que cualquier sistema de computación que tiene las características generales presentadas en la Figura 31 puede ser útil en la práctica de la invención. Más específicamente, la Figura 31, es una representación esquemática de una terminal de trabajo de computación típica que tiene en comunicación eléctrica (100) con otra vía, por ejemplo, un bus interno o una red externa, una unidad procesadora central (101), una memoria de acceso aleatoria (RAM) (102), una memoria de sólo lectura (ROM) (103), un monitor o terminal (104), y óptimamente un dispositivo de almacenamiento externo, por ejemplo, un disquette, un CD ROM, o una cinta magnética (105).

Los sistemas basados en computación de la invención comprenden preferentemente un medio de almacenamiento de datos que tiene almacenado en el mismo una secuencia de un ribosoma o de una subunidad ribosómica o de un fragmento, y/o datos de coordenadas atómicas/datos de difracción de rayos X de la presente invención y los medios de hardware y software necesarios para soportar e implementar un medio de análisis. Como se usa en la presente, "un sistema de computación" o "un sistema basado en computación" se refiere a los medios de hardware, los medios de software, y los medios de almacenamiento de datos usados para analizar la secuencia, los datos de difracción de rayos X, y/o las coordenadas atómicas de la invención. Como se usa en la presente, el término "medios de almacenamiento de datos" se entiende que se refiere a cualquier memoria que puede almacenar datos de secuencias, coordenadas atómicas, y/o datos de difracción de rayos X, o un medio de acceso de memoria que puede acceder a elementos que tienen grabados en los mismos las coordenadas atómicas de la presente invención.

En una realización, un ribosoma o una subunidad ribosómica, o al menos un subdominio de estos, una secuencia de aminoácidos y ácidos nucleicos, datos de difracción de rayos X y/o coordenadas atómicas de la presente invención son grabados en un medio legible por ordenador. Como se usa en la presente, se entiende que la expresión "medio legible por ordenador" significa cualquier medio que pueda ser leído y al que se pueda acceder directamente por un ordenador. Tales medios incluyen, pero no están limitados a: medios de almacenamiento magnéticos, tales como floppy discs, medio de almacenamiento en disco duro y cinta magnética; medios de almacenamiento óptico tales como los discos ópticos o CD-ROM; medios de almacenamiento eléctricos tales como RAM y ROM; e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos. Un experto en el arte puede apreciar fácilmente cómo se puede usar cualquier medio legible por ordenador conocido actualmente para crear un elemento que comprenda un medio legible por ordenador que tenga grabado en el mismo una secuencia de aminoácidos y/o nucleótidos, datos de difracción de rayos X, y/o coordenadas atómicas de la presente invención.

Como se usa en la presente, se entiende que el término "grabado" significa cualquier proceso para almacenar información en un medio legible por ordenador. Un experto en el arte puede adoptar fácilmente cualquiera de los métodos actualmente conocidos para grabar información en un medio legible por ordenador para generar elementos que comprendan una secuencia de aminoácidos o nucleótidos, coordenadas atómicas y/o datos de difracción de rayos X de la presente invención.

Una variedad de estructuras de almacenamiento de datos se encuentran disponibles para un experto en el arte para crear un medio legible por ordenador que tiene grabado en el mismo secuencias de aminoácidos y/o nucleótidos, coordenadas atómicas y/o datos de difracción de rayos X de la presente invención. La elección de la estructura de almacenamiento de datos se basará generalmente en los medios elegidos para acceder a la información almacenada. Además, se puede usar una variedad de programas y formatos de procesamiento de datos para

almacenar la información de las secuencias, los datos de rayos X y/o las coordenadas atómicas de la presente invención en el medio legible por ordenador. La información precedente, los datos y las coordenadas pueden ser representadas en un archivo de texto de procesamiento de palabras, formateado en un software disponible comercialmente, tal como WordPerfect y MICROSOFT Word, o representado en la forma de un archivo ASCII, almacenado en una aplicación de bases de datos, tal como DB2, Sybase, Oracle, o similar. Un experto en el arte puede adaptar fácilmente cualquier número de formatos estructurantes de procesadora (por ejemplo, archivos de texto o bases de datos) para obtener un medio legible por ordenador que tiene grabado en el mismo la información de la presente invención.

Mediante la provisión de un medio legible por ordenador que tiene almacenado en el mismo una secuencia de un ribosoma o de una subunidad ribosómica, y/o coordenadas atómicas, un experto en el arte puede acceder normalmente a la secuencia, y/o a las coordenadas atómicas para modelar un ribosoma o una subunidad ribosómica, un subdominio de estos, un mimético, o un ligando de estos. Los algoritmos de computación se encuentran disponibles públicamente y comercialmente, lo que permite al experto en el arte acceder a estos datos provistos en un medio legible por ordenador y analizarlos para el modelado molecular y/o RDD. Ver, por ejemplo, Biotechnology Software Directory, MaryAnn Liebert Publ., Nueva York, NY (1995).

Aunque no se requieren ordenadores, el modelado molecular puede ser facilitado principalmente usando ordenadores para construir modelos realísticos de un ribosoma, una subunidad ribosómica, o una porción de estos. El modelado molecular también permite el modelado de nuevas moléculas más pequeñas, por ejemplo ligandos, agentes y otras moléculas, que se unen a un ribosoma, una subunidad ribosómica, o una porción de estos. Los métodos utilizados en el modelado molecular comprenden desde gráficos moleculares (es decir, representaciones tridimensionales) a química computacional (es decir, cálculos de las propiedades físicas y químicas) para realizar predicciones acerca de la unión de las moléculas más pequeñas o sus actividades; para diseñar nuevas moléculas; y para predecir nuevas moléculas, incluyendo ligandos tales como fármacos, para la síntesis química.

Para información básica sobre modelado molecular, ver, por ejemplo, M. Schlecht, *Molecular Modeling on the PC* (1998) John Wiley & Sons; Gans et al., *Fundamental Principles of Molecular Modeling* (1996) Plenum Pub. Corp.; N.C. Cohen, ed., *Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design* (1996) Academic Press; y W.B. Smith, *Introduction to Theoretical organic Chemistry and Molecular Modeling* (1996). Las patentes estadounidenses que proveen información detallada sobre modelado molecular incluyen, por ejemplo: patentes U.S. Nos. 6.093.573; 6.080.576; 6.075.014; 6.075.123; 6.071.700; 5.994.503; 5.884.230; 5.612.894; 5.583.973; 5.030.103; 4.906.122; y 4.812.12.

El modelado tridimensional puede incluir, pero no está limitado a, realizar representaciones tridimensionales de estructuras, dibujar ilustraciones de las estructuras, construir modelos físicos de las estructuras, y determinar las estructuras de ribosomas relacionados, subunidades ribosómicas y complejos de ribosoma/ligando y subunidad ribosómica/ligando, usando las coordenadas conocidas. Las coordenadas apropiadas son ingresadas en uno o más programas de computación para modelado molecular, como se conocen en el arte. A modo de ilustración, una lista de programas de computación útiles para ver o manipular estructuras tridimensionales incluyen: Midas (Universidad de California, San Francisco); MidasPlus (Universidad de California, San Francisco); MOIL (Universidad de Illinois); Yummie (Universidad de Yale); Sybil (Tripos, Inc.); Insight/Discover (Biosym Technologies); MacroModel (Universidad de Columbia); Quanta (Molecular Simulations, Inc.); Cerius (Molecular Simulations, Inc.); Alchemi (Tripos, Inc.); LabVision (Tripos, Inc.); Rasmol (Glaxo Research and Development); Ribbon (Universidad de Alabama); NAOMI (Universidad de Oxford); Explorer Eyechem (Silicon Graphics, Inc.); Univision (Cray Research); Molscript (Universidad de Uppsala); Chem-3D (Cambridge Scientific); Chain (Baylor College of Medicine); O (Universidad de Uppsala); GRASP (Universidad de Columbia); X-Plor (Molecular Simulations, Inc.; Universidad de Yale); Spartan (Wavefunction, Inc.); Catalyst (Molecular Simulations, Inc.); Molcadd (Tripos, Inc.); VMD (Universidad de Illinois/Beckman Institute); Sculpt (Interactive Simulations, Inc.); Procheck (Brookhaven National Library); DGEOM (QCPE); RE_VIEW (Brunell University); Modeller (Birbeck College, Universidad de Londres); Xmol (Minnesota Supercomputing Center); Proteína Expert (Cambridge Scientific); HyperChem (Hypercube); MD Display (Universidad de Washington); PKB (National Center for Biotechnology Information, NIH); ChemX (Chemical Design, Ltd.); Cameleon (Oxford Molecular, Inc.); y Ieditis (Oxford Molecular, Inc.).

Una propuesta para RDD es buscar estructuras moleculares conocidas que puedan unirse a un sitio de interés. Usando el modelado molecular, los programas de RDD pueden ver un rango de diferentes estructuras moleculares de moléculas que pueden ajustarse a un sitio de interés, y moviéndolas en la pantalla del ordenador o a través de computación, se puede decidir qué estructuras se ajustan realmente bien al sitio (William Bains (1998) *Biotechnology from A to Z*, segunda edición, Oxford University Press, p. 259).

Una propuesta alternativa pero relacionada comienza con la estructura conocida de un complejo con un ligando de una molécula pequeña y modela modificaciones de esa molécula pequeña en un esfuerzo por realizar interacciones favorables adicionales con un ribosoma o una subunidad ribosómica.

La presente invención permite el uso de técnicas moleculares y de modelado por ordenador para diseñar y seleccionar nuevas moléculas, tales como antibióticos u otros agentes terapéuticos, que interactúan con ribosomas y subunidades ribosómicas. Tales antibióticos y otros tipos de agentes terapéuticos incluyen, pero no están limitados

a, antifúngicos, antivirales, antibacterianos, insecticidas, herbicidas, miticidas, rodenticidas, etc.

Para facilitar el modelado molecular y/o el RDD, el experto en el arte puede usar algunas o todas las coordenadas atómicas depositadas en el Banco de Datos de Proteínas del RCSB con el número de acceso PDB ID: 1FFK, 1JJ2, 1FFZ, IFG0, 1K73, 1KC8, 1K8A, 1KD1 o 1K9M, y/o las coordenadas atómicas contenidas en el Disco N.º1. Además, el experto en el arte, usando las coordenadas atómicas precedentes, puede generar coordenadas atómicas adicionales a través de, por ejemplo, modelado molecular usando, por ejemplo, técnicas de modelado de homología y/o de reemplazo molecular, que juntas definen al menos una porción de un modelo de un ribosoma de otra especie de interés. Usando las coordenadas atómicas antes mencionadas, el experto en el arte puede diseñar inhibidores de la síntesis de proteínas que pueden ser adaptadas para ser efectivas contra los ribosomas de una o más especies, pero que tienen poco o ningún efecto sobre los ribosomas de otras especies. Tales inhibidores pueden ser inhibidores competitivos. Como se usa en la presente, el término "inhibidor competitivo" se refiere a un inhibidor que se une a la forma activa de un ribosoma o una subunidad ribosómica en los mismos sitios que su(s) sustrato(s) o ARNt(s), compitiendo así directamente con ellos. El término "forma activa" de un ribosoma o una subunidad ribosómica se refiere a un ribosoma o una subunidad ribosómica en un estado que hace que sea capaz de una síntesis de proteínas. La inhibición competitiva puede ser revertida completamente aumentando el sustrato o la concentración de ARNt.

Esta invención también permite el diseño de moléculas que actúan como inhibidores no competitivos de la síntesis de proteínas. Como se usa en la presente, el término "inhibidor no competitivo" se refiere a una molécula que inhibe la actividad funcional de un ribosoma o una subunidad ribosómica uniéndose a un sitio diferente en el ribosoma o la subunidad ribosómica que lo que hacen sus sustratos, o ARNt. Tales inhibidores frecuentemente pueden unirse al ribosoma o la subunidad ribosómica con el sustrato o ARNt y no al ribosoma o a la subunidad ribosómica propiamente dichos. La inhibición no competitiva no puede ser revertida completamente aumentando la concentración del sustrato. Estos inhibidores pueden unirse a, todos o una porción de, los sitios activos u otras regiones de la subunidad ribosómica grande ya unidos a su sustrato y pueden ser potentes y menos no específicos que los inhibidores competitivos conocidos que compiten por los sitios activos de la subunidad ribosómica grande o por la unión a la subunidad ribosómica grande.

Similarmente, los inhibidores no competitivos que se unen a, e inhiben la síntesis de proteínas, ya sea que estén unidos o no a otra entidad química, pueden ser diseñados usando las coordenadas atómicas de las subunidades ribosómicas grandes o complejos que comprenden la subunidad ribosómica grande de esta invención. Como se usa en la presente, el término "inhibidor no competitivo" se refiere a un inhibidor que puede unirse o bien a la forma libre o al sustrato o al ARNt unido del ribosoma o de la subunidad ribosómica.

Los expertos en el arte pueden identificar a los inhibidores como competitivos o no competitivos por los datos cinéticos enzimáticos ajustados por ordenador usando la ecuación estándar de acuerdo con Segel, I.H., (1975) *Enzyme Kinetics: Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, (Wiley Classics Library). Debería entenderse que los inhibidores no competitivos de acuerdo con la presente invención pueden unirse a los mismos sitios o sitios de unión diferentes.

Alternativamente, las coordenadas atómicas provistas por la presente invención son útiles para diseñar análogos mejorados de inhibidores conocidos de la síntesis de proteínas o para diseñar nuevas clases de inhibidores basados en las estructuras atómicas y coordenadas de los cristales del complejo de subunidad ribosómica/CCdA-p-puro 50S y el complejo de subunidad ribosómica/aa-ARNt análogo 50S. Esto provee un nuevo camino para diseñar inhibidores de la síntesis de proteínas con alta especificidad, estabilidad y otras cualidades tipo fármaco (Lipinski et al. (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23:3).

Las coordenadas atómicas de la presente invención también permiten sondear la estructura tridimensional de un ribosoma o subunidad ribosómica o una porción de estos con moléculas compuestas por una variedad de diferentes características químicas para determinar sitios óptimos para la interacción entre inhibidores candidato y/o activadores y el ribosoma o la subunidad ribosómica. Por ejemplo, las coordenadas atómicas de alta resolución basadas en los datos de difracción de rayos X recogidos de cristales saturados con solvente permiten la determinación de dónde se pega cada tipo de molécula de solvente. Las moléculas pequeñas que se unen a esos sitios pueden ser diseñadas y sintetizadas y testeadas entonces con respecto a su actividad inhibidora (Travis, J. (1993) *Science* 262: 1374). Además, cualquier antibiótico, inhibidor u otra molécula pequeña, conocidos, que se une a la subunidad grande de *H. marismortui* puede ser embebido en cristales de subunidad grande de *H. marismortui* y su modo exacto de unión puede ser determinado a partir de los mapas de densidad electrónica de diferencia. Estas moléculas pueden representar compuestos principales a partir de los cuales se pueden sintetizar compuestos mejores tipo fármaco.

b. Identificación de los sitios objetivo.

Las coordenadas atómicas de la invención permiten al experto en el arte identificar las ubicaciones objetivo en un ribosoma o una subunidad ribosómica grande que pueden servir como punto de partida en un diseño racional de fármacos. Como un umbral, las coordenadas atómicas de la invención permiten al experto en el arte identificar regiones específicas dentro de un ribosoma o una subunidad ribosómica que están involucrados en la síntesis de

5 proteínas y/o la secreción de proteínas fuera del ribosoma. Además, las coordenadas atómicas de la invención permiten a un experto en el arte identificar además porciones de estas regiones que están conservadas o que no están conservadas entre diferentes organismos. Por ejemplo, identificando porciones de estas regiones que están conservadas entre algunos patógenos, por ejemplo, algunos procariontes, pero no están conservados en un organismo huésped, por ejemplo, un eucariota, más preferentemente un mamífero, el experto en el arte puede diseñar moléculas que inhiben selectivamente o interrumpen la actividad de síntesis de proteínas del patógeno pero no los ribosomas del huésped. Además, analizando las regiones que están o bien conservadas o no conservadas entre algunos patógenos, puede ser posible diseñar inhibidores de espectro amplio o estrecho de la síntesis de proteínas, por ejemplo, antibióticos, cuando surja una necesidad particular.

10 La Figura 32, es una representación esquemática de una subunidad ribosómica grande que identifica una variedad de sitios objetivo ilustrativos que parecen participar en la síntesis de proteínas dentro del ribosoma y/o la exportación o translocación de la proteína recién sintetizada fuera del ribosoma. Los sitios objetivo incluyen, por ejemplo, el sitio P (200), el sitio A (201), el centro de la peptidiltransferasa (202), el sitio de la peptidiltransferasa (203) que incluye al menos una porción del sitio P y del sitio A, un dominio que une un factor (204) incluyendo, por ejemplo, el dominio que une a EF-Tu y el dominio que une a EF-G, el túnel de salida de polipéptidos (205) incluyendo cavidades definidas por la pared del túnel de salida, y el dominio de unión de la partícula de reconocimiento de señales (206).

15 A modo de ejemplo, la inspección de las coordenadas atómicas de la subunidad ribosómica 50S de *H. marismortui* ha identificado una variedad de regiones objetivo que pueden servir como una base para el diseño racional de fármacos de inhibidores de la síntesis de proteínas nuevos o modificados. Las regiones objetivo incluyen el sitio de la peptidiltransferasa, el sitio A, el sitio P, el túnel de salida de polipéptidos, algunas cavidades dispuestas en la pared del túnel de salida de polipéptidos (por ejemplo, cavidad 1 y cavidad 2), y algunos bolsillos de unión de antibióticos. Los residuos que juntos definen al menos una porción de cada una de las regiones precedentes son identificados en las siguientes tablas. Sin embargo, se considera que los mismos sitios o sitios objetivos similares pueden ser identificados en un ribosoma o una unidad ribosómica de interés usando los principios descritos en la presente. Además, estos principios pueden ser empleados usando cualquiera de los conjuntos primarios de coordenadas atómicas provistos en la presente o cualesquiera conjuntos de coordenadas atómicas adicionales, por ejemplo, conjuntos de coordenadas atómicas secundarios, que pueden ser generados por modelado molecular de cualquier ribosoma o subunidad ribosómica de interés.

20 La Tabla 5A identifica los residuos en la subunidad ribosómica 50S de *H. marismortui* que juntos definen al menos una porción del sitio ribosómico de la peptidiltransferasa (capa 5,8 Å). Además, la Tabla 5A identifica los residuos correspondientes que definen al menos una porción del sitio ribosómico de la peptidiltransferasa en *E. coli*, *Rattus*, seres humanos, y la subunidad grande en la mitocondria humana. La Tabla 5B identifica los residuos en la subunidad ribosómica 50S de *H. marismortui* que juntos definen una porción más ancha del sitio ribosómico de la peptidiltransferasa (capa 5,8 Å-12,6 Å). Los residuos no conservados fueron identificados por comparación de secuencias de la estructura de ARNr 23S de *H. marismortui* o una proteína ribosómica que forma los sitios arriba mencionados con las secuencias correspondientes de ADN genómico alineadas que codifican o bien el ARN 23S homólogo o la proteína ribosómica de los otros organismos.

Tabla 5A. Residuos que definen el sitio de peptidiltransferasa ribosómica (envuelta de 5,8 Å)

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-resp.en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
<u>23S ARNs</u>				
G2102	G2061	G3632	G3876	G1054
A2103	A2062	A3633	A3877	A1055
C2104	C2063	C3634	C3878	C1056
C2105	C2064	C3635	C3879	C1057
C2106	C2065	C3636	C3880	C1058
G2284	G2251	G3971	G4156	G1145
G2252	G2252	G3918	G4157	G1146
G2286	G2253	G3919	G4158	G1147
A2474	A2439	A4106	A4345	A1256

ES 2 448 815 T3

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-rresp.en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
G2482	G2447	G4114	G4353	G1264
A2485	A2450	A4117	A4356	A1267
A2486	A2451	A4118	A4357	A1268
C2487	C2452	C4119	4358	C1269
A2488	A2453	U4120	U4359	A1270
U2528	U2493	U1460	U4399	U1310
G2529	G2494	G4161	G4400	A1311
C2536	C2501	C4168	C4407	C1318
A2538	A2503	A4170	A4409	A1320
G2540	G2505	G4172	G4411	G1322
U2541	U2506	U4173	U4412	U1323
G2542	C2507	C4174	C4413	U1324
G2543	G2508	G4175	G4414	G1325
G2588	G2553	G4220	G4459	G1370
U2589	U2554	U4221	U4460	U1371
U2590	U2555	U4222	U4461	U1372
C2608	C2573	C4240	C4479	C1390
G2617	G2582	G4249	G4488	A1399
G2618	G2583	G4250	G4489	G1400
U2619	U2584	U4251	U4490	U1401
U2620	U2585	U4252	U4491	U1402
C2636	C2601	C4268	C4507	C1418
A2637	A2602	A4269	A4508	A1419
G2638	G2603	G4270	G4509	G1420

Se determinó que los residuos que conjuntamente definen el sitio de peptidiltransferasa (envuelta de 5,8 Å) eran aquellos residuos en la subunidad ribosómica 50S que se hallan dentro de 5,8 angstroms de los átomos del ligando sitio CC-puomicina-A y de los átomos de la parte CCdA-PO₂ del inhibidor de estado de transición de CCdA-p-puomicina (Códigos de acceso: 1fg0 y 1ffz, respectivamente) mediante el programa MIDAS^a. Se determinaron residuos conservados en 23S ARNr mediante comparación de secuencias del 23S ARNr^b de *H. marismortui* con secuencias genómicas de ADN que codifican el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f). Se determinaron las alineaciones de secuencias con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.), para lo cual se utilizaron los parámetros por defecto.

5 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6(1): 13-27, 36-37.

b) Número de acceso a Genbank AF034619

- c) Número de acceso a Genbank J01695
- d) Número de acceso a Genbank 2624399
- e) Número de acceso a Genbank M11167
- f) Número de acceso a Genbank 13683

5 Tabla 5B. Residuos que definen el sitio de peptidiltransferasa ribosómica (envuelta de 5,8 Å-12,6)

Residuo H. Marismortui	Residuo corr. en <i>E. coli</i>	Residuo correspon- diente en <i>Rattus</i>	Residuo correspon- diente en humano	Residuo correspon- diente en mitocondrias humanas
<u>23S ARNs</u>				
C1750	A1672	C2692	C2830	A732
C1982	C1941	C3515	C3757	A934
C1983	C1942	C3514	C3758	C935
U1984	U1943	U3515	U3759	U936
U1985	U1944	C3516	C3760	U937
U1996	U1955	U3527	U3771	U948
C2006	C1965	C3537	C3781	U958
A2007	A1966	A3538	A3782	A959
G2073	G2032	C3603	C3847	G1025
A2100	A2059	A3630	A2874	A1052
A2103	A2062	A3633	A3877	A1055
U2107	C2066	U3637	U3881	U1059
U2282	U2249	U3915	U4154	U1143
G2283	G2250	G3916	G4155	G1144
C2287	C2254	C3920	C4159	C1148
G2288	G2255	G3921	G4160	G1149
C2309	G2275	C3942	C4181	C1154
G2472	G2437	U4104	U4343	U1254
U2473	U2438	U4105	U4344	U1255
C2476	U2441	C4108	C4347	C1258
A2479	G2444	A4111	A4350	A1261
G2480	G2445	G4112	G4351	G1262
G2481	G2446	G4113	G4352	G1263
G2482	G2447	G4114	G4353	G1264
U2484	U2449	U4116	U4355	U1266
G2489	G2454	G4121	G4360	G1271

ES 2 448 815 T3

Residuo H. Marismortui	Residuo corr. en <i>E. coli</i>	Residuo correspon- diente en <i>Rattus</i>	Residuo correspon- diente en humano	Residuo correspon- diente en mitocondrias humanas
<u>23S ARNs</u>				
A2490	G2455	G4122	G4361	C1272
C2526	U2491	U4158	U4397	U1308
U2527	U2492	U4159	U4398	U1309
G2529	G2494	G4161	G4400	A1311
C2530	G2495	A4162	A4401	C1312
U2531	C2496	U4163	U4402	G1313
A2532	A2497	C4164	C4403	A1314
C2534	C2499	U4166	U4405	C1316
U2535	U2500	U4167	U4406	G1319
G2537	G2502	G4169	G4408	U1317
A2538	A2503	A4170	A4409	A1320
U2539	U2504	U4171	U4410	U1321
G2540	G2505	G4172	G4411	G1322
G2544	G2509	G4176	G4415	G1326
U2587	U2552	U4219	U4458	U1369
C2591	C2556	C4223	C4462	C1373
C2592	G2257	A4224	A4463	A1374
A2604	G2569	G4236	G4475	C1386
G2605	G2570	G4237	G4476	C1387
U2607	A2572	A4239	A4478	A1389
G2609	G2574	G4241	G4480	G1391
U2610	C2575	U4242	U4481	U1392
G2611	G2576	G4243	G4482	G1393
G2616	G2581	G4248	G4487	G1398
G2617	G2582	G4249	G4488	A1399
U2621	U2586	U4253	U4492	A1404
A2622	A2587	A4254	A4493	C1403
G2627	G2592	G4259	G4498	G1409
U2628	U2593	U4260	U4499	G1410
G2634	G2599	G4266	G4505	U1416
A2635	A2600	A4267	A4506	C1417

Residuo H. Marismortui	Residuo corr. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
<u>23S ARNs</u>				
G2638	G2603	G4270	G4509	G1420
G2639	U2604	G4271	G4510	G1421
U2640	U2605	U4272	U4511	U1422
G2643	G2608	G4275	G4514	G1425
U2645	C2610	U4277	U4516	U1427
Proteína L3				
P1	NP*	S2	S2	P2
Proteína L10E				
D109	XX**	T113	T113	XX
G110	XX	G114	G114	XX
Proteína L10E				
R112	XX	R115	R116	XX

- Se determinó que los residuos que conjuntamente definen el sitio de peptidiltransferasa (envuelta de 5,8 Å- 12,6 Å) eran aquellos residuos en la subunidad ribosómica 50S que se hallan dentro de 5,8 – 12,6 angstroms de los átomos del ligando sitio CC-puromicina-A y de los átomos de la parte CCdA-PO₂ del inhibidor de estado de transición de CCdA-p-puromicina (Códigos de acceso: 1fg0 y 1 ffz, respectivamente) mediante el programa MIDAS^a. Se determinaron residuos conservados en 23S ARNr mediante comparación de secuencias del 23S ARNr^b de *H. marismortui* con las correspondientes secuencias genómicas alineadas de ADN que codifican el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f). En el caso de las proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre las secuencias estructurales de proteínas^g de *H. marismortui* y las correspondientes secuencias de proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E.coli*ⁱ, *rattus norvegicus*^j, humano^k o mitocondrias humanas^l. Las alineaciones de secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) mediante la utilización de parámetros por defecto. *NP significa que no se ha identificado ningún residuo homólogo. ** XX significa que en dichas especies no se ha identificado ninguna proteína homóloga.
- 5 a) a. T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27,36-37.
- 10 b) Número de acceso a Genbank AF034619 c) Número de acceso a Genbank J01695
- d) Número de acceso a Genbank 2624399
- e) Número de acceso a Genbank M11167
- 20 f) Número de acceso a Genbank 13683 g) Número de acceso a Genbank AAA86859 para la proteína L3; número de acceso a Genbank 15825950 para la proteína L10E.
- i) Número de acceso a Genbank CAA26460 para la proteína L3.
- j) Número de acceso a Genbank P21531 para la proteína L3; número de acceso a Genbank NP 112362 para la proteína L10E.
- 25 k) Número de acceso a Genbank NP 000958 para la proteína L3; número de acceso a Genbank NP 006004 para la proteína L10E.
- l) Número de acceso a Genbank P09001 para la proteína L3.

5 La Tabla 6A identifica los residuos en la subunidad ribosómica de *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen por lo menos una porción del sitio ribosómico A (envuelta 5,8 Å). Además, la Tabla 6A identifica los correspondientes residuos que definen por lo menos una porción del sitio ribosómico A en *E. coli*, *Rattus*, humano, y subunidad grande de mitocondrias humanas. La Tabla 6B identifica los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen una porción más amplia del sitio ribosómico A (envuelta 5,8 Å-12,6 Å). Los residuos no conservados han sido identificados como anteriormente descrito con respecto a las Tablas 5A y 5B.

Tabla 6A. Residuos que definen el sitio ribosómico A (envuelta de 5,8 Å)

Residuo <i>Marismortui</i>	<i>H.</i>	Residuo correspondiente en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
<u>23S ARNr</u>					
G2102		G2061	G3632	G3876	G1054
C2104		C2063	C3634	C3878	C1056
A2485		A2450	A4117	A4356	A1267
A2486		A2451	A4118	A4357	A1268
C2487		C2452	C4119	C4358	C1269
A2488		U2453	U4120	U4359	A1270
U2528		U2493	U4160	U4399	U1310
G2529		G2494	G4161	U44009	A1311
C2536		C2501	C4168	C4407	C1318
U2541		U2506	U4173	U4412	U1323
C2542		C2507	C4174	C4413	U1324
G2543		G2508	G4175	G4414	G1325
G2588		G2553	G4220	G4459	G1370
U2589		U2554	U4421	U4460	U1371
U2590		U2555	U4222	U4461	U1372
C2608		C2573	C4240	C4479	C1390
G2618		G2583	G4250	G4489	G1400
U2619		U2584	U4251	G4490	U1401
U2620		U2585	U4252	U4491	U1402

10 Se determinó que los residuos que conjuntamente definen el sitio A (envuelta de 5,8 Å) eran aquellos residuos en la subunidad ribosómica 50S que se hallan dentro de 5,8 angstroms de los átomos del ligando del sitio CC-puromicina-A (código de acceso PDB 1fg0) mediante el programa MIDAS^a. Se determinaron residuos conservados en 23S ARNr mediante comparación de secuencias de la estructura 23S ARNr^b de *H. marismortui* con las correspondientes secuencias de ADN genómico alineado que codifican el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f). Las alineaciones de secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) mediante la utilización de parámetros por defecto.

15 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6(1): 13-27, 36-37.

b) Número de acceso a Genbank AF034619

c) Número de acceso a Genbank J01695

d) Número de acceso a Genbank 2624399

ES 2 448 815 T3

e) Número de acceso a Genbank M11167

f) Número de acceso a Genbank 13683

Tabla 6B. Residuos que definen el sitio ribosómico A (envuelta de 5,8 Å-12,6 Å)

Residuo <i>Marismortui</i>	<i>H.</i> Residuo correspondiente en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
C1750	A1672	C2692	C2830	A732
C1982	C1941	C3513	C3757	A934
C1983	C1942	C3514	C3758	C935
U1984	U1943	U3515	U3759	U936
U1985	U1944	C3516	C3760	U937
U1996	U1955	U3527	U3771	U948
G2073	G2032	C3603	C3847	G1025
A2100	A2059	A3630	A3874	A1052
A2103	A2062	C3633	A3877	A1055
C2105	C2064	C3635	C3879	C1057
C2106	C2065	C3636	C3880	C1058
U2107	C2066	U3637	U3881	U1059
G2284	G2251	G3917	G4156	G1145
G2285	G2252	G3918	G4157	G1146
A2474	A2439	A4106	A4345	A1256
A2479	G2444	A4111	A4350	A1261
G2480	G2445	G4112	G4351	G1262
G2481	G2446	G4113	G4352	G1263
G2482	G2447	G4114	G4353	G1264
U2484	U2449	U4116	U4355	U1266
G2489	G2454	G4121	G4360	G1271
A2490	G2455	G4122	G4361	C1272
C2526	U2491	U4158	U4397	U1308
U2527	U2492	U4159	U4398	U1309
C2530	G2495	A4162	A4401	C1312
U2531	C2496	U4163	U4402	G1313
A2532	A2497	C4164	C4403	A1314
C2534	C2499	U4166	U4405	C1316
U2535	U2500	U4167	U4406	U1317

ES 2 448 815 T3

G2537	G2502	G4169	G4408	G1319
A2538	A2503	A4170	A4409	A1320
U2539	U2504	U4171	U4410	U1321
G2540	G2505	G4172	G4411	G1322
G2544	G2509	G4176	G4415	G1326
U2587	U2552	U4219	U4458	U1369
C2591	C2556	C4223	C4462	C1373
G2592	G2257	A4224	A4463	A1374
A2604	G2569	G4236	G4475	C1386
G2605	G2570	G4237	G4476	C1387
U2607	A2572	A4239	A4478	A1389
G2609	G2574	G4241	G4480	G1391
U2610	C2575	U4242	U4481	U1392
G2611	G2576	G4243	G4482	G1393
G2616	G2581	G4248	G4487	G1398
G2617	G2582	G4249	G4488	A1399
U2621	U2586	U4253	U4492	C1403
C2636	C2601	C4268	C4507	C1418
A2637	A2602	A4269	A4508	A1419
A2637	A2602	A4269	A4508	A1419
G2638	G2603	G4270	G4509	G1420
G2639	U2604	G4271	G4510	G1421
U2640	U2605	U4272	U4511	U1422
G2643	G2608	G4275	G4514	G1425
U2645	C2610	U4277	U4516	U1427
Proteína L3				
P1	NP*	S2	S2	P2

Se determinó que los residuos que definen el sitio A (envuelta de 5,8 Å-12,6 Å) eran aquellos residuos en la subunidad ribosómica 50S que se hallan dentro de 5,8-12,6 angstroms de los átomos del ligando del sitio CC-puromicina A (código de acceso PDB 1fg0) mediante el programa MIDAS^a. Se determinaron los residuos conservados en 23S ARNr mediante comparación de secuencias de la estructura de 23S ARNr^b de *H. marismortui* con las correspondientes secuencias del ADN genómico alineado que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondria humana^f). En los casos de proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre la secuencia^g estructura de proteína de *H. marismortui* y las correspondientes secuencias de secuencias de proteína alineadas que codifican proteínas homólogas en *E. coli*, *Rattus norvegicus*^h humano o mitocondrias humanasⁱ. Las alineaciones de las secuencias se determinaron mediante el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) con parámetros por defecto. *NP significa que no se identificó ningún residuo homólogo.

a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6(1): 13-27, 36-37.

b) Número de acceso a Genbank AF034619

- c) Número de acceso a Genbank J01695
- d) Número de acceso a Genbank 2624399
- e) Número de acceso a Genbank M11167
- f) Número de acceso a Genbank 13683
- 5 g) Número de acceso a Genbank AAA86859 para la proteína L3.
- i) Número de acceso a Genbank CAA26460 para la proteína L3.
- j) Número de acceso a Genbank P21531 para la proteína L3.
- k) Número de acceso a Genbank NP_000958 para la proteína L3.
- l) Número de acceso a Genbank P09001 para la proteína L3.
- 10 La Tabla 7A identifica los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen por lo menos una porción del sitio ribosómico A (envuelta 5,8 Å). Además, la Tabla 7A identifica los correspondientes residuos que definen por lo menos una porción del sitio ribosómico P en *E. coli*, *Rattus*, *humano*, y subunidad grande de mitocondrias humanas. La Tabla 7B identifica los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen una porción más amplia del sitio ribosómico P (envuelta 5,8 Å-12,6 Å). Los residuos no
- 15 conservados han sido identificados como anteriormente descrito con respecto a las Tablas 5A y 5B.

Tabla 7A. Residuos que definen el sitio ribosómico P (envuelta de 5,8 Å)

Residuo <i>Marismortui</i>	<i>H.</i>	Residuo correspondiente en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
<u>23S ARNr</u>					
C2104		C2063	C3634	C3878	C1056
C2105		C2064	C3635	C3879	C1057
C2106		C2065	C3636	C3880	C1058
G2284		G2251	G3917	G4156	G1145
G2285		G2252	G3918	G4157	G1146
G2286		G2253	G3919	G4158	G1147
A2474		A2439	A4106	A4345	A1256
A2485		A2450	A4117	A4356	A1267
A2486		A2451	A4118	A4357	A1268
U2619		U2584	U4251	U4490	U1401
U2620		U2585	U4252	U4491	U1402
C2636		C2601	C4268	C4507	C1418
A2637		A2602	A4269	A4508	A1419
G2638		G2603	G4270	G4509	G1420

20 Se determinó que los residuos que conjuntamente definen el sitio P (envuelta de 5,8 Å) eran aquellos residuos en la subunidad ribosómica 50S ribosómico que se hallan dentro de 5,8 angstroms de los átomos de la parte CCdA-PO₂ del inhibidor de estado de transición de CCdA-p-puomicina (Figura 10a) (código de acceso PDB 1 ffz) mediante el programa MIDAS^a. Se determinaron los residuos conservados en 23S ARNr mediante comparación de secuencias de la estructura de 23S ARNr^b de *H. marismortui* con las correspondientes secuencias del ADN genómico alineado que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondria humana^f). Las alineaciones de las secuencias se determinaron mediante el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) con parámetros por defecto.

ES 2 448 815 T3

a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6(1): 13-27, 36-37.

b) Número de acceso a Genbank AF034619

c) Número de acceso a Genbank J01695

5 d) Número de acceso a Genbank 2624399

e) Número de acceso a Genbank M11167

f) Número de acceso a Genbank 13683

Tabla 7B. Residuos que definen el sitio ribosómico P (envuelta 5,8 Å-12,6 Å)

Residuo <i>Marismortui</i>	<i>H.</i> Residuo correspondiente en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
C1982	C1941	C3513	C3757	A934
C2006	C1965	C3537	C3781	U958
A2007	A1966	A3538	A3782	A959
G2102	G2061	G3632	G3876	G1054
A2103	A2062	A3633	A3877	A1055
U2107	C2066	U3637	U3881	U1059
U2282	U2249	U3915	U4154	U1143
G2283	G2250	G3916	G4155	G1144
C2287	C2254	C3920	C4159	C1148
G2288	G2255	G3921	G4160	G1149
C2309	C2275	C3942	C4181	C1154
C2472	G2437	U4104	U4343	U1254
U2473	U2438	U4105	U4344	U1255
C2476	U2441	C4108	C4347	C1258
G2481	G2446	G4113	G4352	G1263
G2482	G2447	G4114	G4353	G1264
U2484	U2449	U4116	U4355	U1266
C2487	C2452	C4119	C4358	C1269
A2488	A2453	U4120	U4359	A1270
U2528	U2493	U4160	U4399	U1310
G2529	G2494	G4161	G4400	A1311
C2530	G2495	A4162	A4401	C1312
U2531	C2496	U4163	U4402	G1313
A2532	A2497	C4164	C4403	C1314

ES 2 448 815 T3

C2534	C2499	U4166	U4405	C1316
U2535	U2500	U4167	U4406	U1317
C2536	C2501	C4168	C4407	C1318
A2538	A2503	A4170	A4409	A1320
G2540	G2505	G4172	G4411	G1322
U2541	U2506	U4173	U4412	U1323
C2542	C2507	C4174	C4413	U1324
C2608	C2573	C4240	C4479	C1390
G2611	G2576	G4243	G4482	G1393
G2618	G2583	G4250	G4489	G1400
U2621	U2586	U4253	U4492	C1403
A2622	A2587	A4254	A4493	A1404
G2627	G2592	G4259	G4498	G1409
U2628	U2593	U4260	U4499	G1410
G2634	G2599	G4266	G4505	U1416
A2635	A2600	A4267	A4506	C1417
G2639	U2604	G4271	G4510	G1421
U2640	U2605	U4272	U4511	U1422
G2643	G2608	G4275	G4514	G1425
Proteína L10E				
D109	XX**	T113	T113	XX
G110	XX	G114	G114	XX
R112	XX	R115	R116	XX

5 Se determinó que los residuos que conjuntamente definen el sitio P (envuelta de 5,8 Å- 12,6 Å) eran aquellos residuos en la subunidad ribosómica 50S que se hallan dentro los átomos de la parte CCdA-PO₂ del inhibidor de estado de transición de CCdA-p-puromicina (Figura 10a) (Códigos de acceso PDB 1fffz) mediante el programa MIDAS^a. Se determinaron los residuos conservados en 23S ARNr mediante comparación de secuencias de la estructura de 23S ARNr^b de *H. marismortui* con las correspondientes secuencias de ADN genómicas alineadas que codifican el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f). En el caso de las proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre las secuencias estructurales de proteínas^g de *H. marismortui* y las correspondientes secuencias de proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E. coli*^h, *rattus norvegicus*ⁱ, humano^k o mitocondrias humanas^l. Las alineaciones de secuencias fueron determinadas mediante el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) bajo la utilización de parámetros por defecto. ** XX significa que en dichas especies no se ha identificado ninguna proteína homóloga.

10 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6(1): 13-27, 36-37. b) Número de acceso a Genbank AF034619

15 c) Número de acceso a Genbank J01695

d) Número de acceso a Genbank 2624399

e) Número de acceso a Genbank M11167

f) Número de acceso a Genbank 13683

g) Número de acceso a Genbank 15825950 para la proteína L10E.

i) No hay un Número de acceso a Genbank para la proteína L10E.

j) Número de acceso a Genbank NP_112362 para la proteína L10E.

k) Número de acceso a Genbank NP_006004 para la proteína L10E.

5 l) No hay un Número de acceso a Genbank que se compare con la proteína L10E

10 La Tabla 8A identifica los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que se hallan dentro de 10 angstroms de un polipéptido naciente hipotético dentro del túnel de salida ribosómico (envuelta 10 Å). Además, la Tabla 8A identifica los correspondientes residuos que definen por lo menos una porción del túnel de salida del polipéptido ribosómico en *E. coli*, *Rattus*, *humano*, y subunidad grande de mitocondrias humanas. Por otra parte, en la Tabla 8B se identifican los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que se hallan dentro de 10 – 15 angstroms de un polipéptido naciente dentro del túnel de salida ribosómico (envuelta 10- 15 angstroms). Los residuos no conservados han sido identificados como anteriormente descrito con respecto a las Tablas 5A y 5B.

Tabla 8A. Residuos que definen el túnel de salida ribosómico (envuelta 10 Å)

Residuo <i>Marismortui</i>	<i>H.</i> Residuo correspondiente en <i>E-coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
<u>23S ARNr</u>				
A60	A64	C729 *	C682	PN*
G88	G93	G764	G713	NP
G89	A94	G765	G714	NP
A90	A95	C766	C715	NP
A462	C456	C1112	C1195	NP
U465	U459	G1116	G1199	NP
A466	A460	G1117	G1200	NP
G467	C461	G1118	G1201	NP
U468	C462	G1119	A1202	NP
G75	G460	U1127	U1208	NP
A476	A470	C1128	C1209	NP
A477	A471	A1129	U1210	NP
C478	A472	C1130	C1211	NP
U488	A482	C1140	C1221	NP
A497	G491	G1151	G1233	NP
A498	A492	G1152	A1234	NP
A513	A507	A1167	G1249	NP
G514	A508	A1168	A1250	NP
A767	A676	A1425	A1503	NP
U835	U744	U1491	U1570	NP
C839	U746	G1495	G1574	NP

ES 2 448 815 T3

U840	U747	U1496	U1575	NP
A841	G748	G1497	G1576	NP
A844	A751	A1500	A1579	NP
U845	A752	A1501	A1580	NP
U1359	U1255	U2191	U2327	U351
C1360	G1256	C2192	C2328	G352
C1361	C1257	U2193	U2329	U353
U1362	U1258	U2194	U2330	C354
G1363	G1259	G2195	G2331	C355
G1364	A1260	G2196	G2332	A356
A1424	U1318	G2255	G2391	G412
G1425	C1319	U2256	U2392	U413
C1426	C1320	G2257	G2393	A414
A1427	A1321	A2258	A2394	A415
C1428	A1322	A2259	A2395	A416
U1429	C1323	C2260	C2396	U417
G1430	G1324	A2261	A2397	NP
C1439	G1333	A2270	A2406	U426
U1440	G1334	C2271	C2407	A427
G1441	C1225	A2272	A2408	G428
A1442	A1336	U2273	U2409	U429
A1689	A1814	C2635	C2771	A680
C1690	C1615	A2636	A2772	U681
G1837	U1781	A3368	A3612	C831
U1838	U1782	U3369	U3613	C832
A2054	A2013	A3585	A3829	A1006
A2055	A2014	A3586	A3830	A1007
A2055	A2014	A3586	A3830	A1007
C2056	A2015	A3587	A3831	A1008
U2057	U2016	C3588	C3832	U1009
C2098	G2057	A3628	A3872	A1050
G2099	A2058	G3629	G3873	G1051
A2100	A2059	A3630	A3874	A1052
A2101	A2060	A3631	A3875	A1053
G2102	G2061	G3632	G3876	G1054

ES 2 448 815 T3

A2103	A2062	A3633	A3877	A1055
C2104	C2063	C3634	C3878	C1056
C2105	C2064	C3635	C3879	C1057
A2474	A2439	A4106	A4345	A1256
C2477	C2442	A4109	A4348	C1259
U2478	C2443	C4110	C4349	U1260
G2481	G2446	G4113	G4352	G1263
G2482	G2447	G4114	G4353	G1264
A2485	A2450	A4117	A4356	A1267
A2486	A2451	A4118	A4357	A1268
C2487	C2452	C4119	C4358	C1269
A2488	A2453	U4120	U4359	A1270
C2536	C2501	C4168	C4407	C1318
G2537	G2502	G4169	G4408	G1319
A2538	A2503	A4170	A4409	A1320
U2539	U2504	U4171	U4410	U1321
G2540	G2505	G4172	G4411	G1322
U2541	U2506	U4173	U4412	U1323
C2542	C2507	C4174	C4413	U1324
C2608	C2573	C4240	C4479	C1390
G2611	G2576	G4243	C4482	G1393
U2620	U2585	U4252	U4491	U1402
G2616	G2581	G4248	G4487	G1398
G2618	G2583	G4250	G4489	G1400
U2619	U2584	U4251	U4490	U1401
U2621	U2586	U4253	U4492	C1403
A2637	A2602	A4269	A4508	A1419
C2644	U2609	U4276	U4515	U1426
U2645	C2610	U4277	U4516	U1427
G2646	C2611	U4278	U4517	U1428
C2647	C2612	U4279	U4518	C1429
Proteína L4				
E59	E51	E65	E65	R70
S60	V52	S66	S66	G71
F61	T53	W67	W67	F72

ES 2 448 815 T3

G62	G54	G68	G68	E73
S63	S55	T69	T69	Q74
G64	G56	G70	G70	E75
R65	K57	R71	R71	R76
G56	NP*	A72	A72	G78
Q67	NP	V73	V73	L79
A68	NP	A74	A74	A80
H69	K58	R75	R75	D81
V70	P59	I76	I76	L82
P71	W60	P77	P77	H83
K72	R61	R78	R78	P84
L73	Q62	V79	V79	D85
D74	G64	G81	G81	F87
G75	T65	G82	G82	A88
R76	G66	G83	G83	T89
A77	R67	T84	T84	A90
Proteína L22				
E20	H9	N21	N21	Q73
E121	S81	K124	K124	P177
Q122	M82	M125	M125	P178
Q123	K83	R126	R126	P179
G124	R84	R127	R127	P180
R125	185	R128	R128	E181
K126	M86	T129	T129	P182
<u>Proteína L22</u>				
P127	P87	Y130	Y130	P183
R128	R88	R131	R131	K184
A129	A89	A132	A132	A186
M130	K90	H133	H133	V187
G131	G91	G134	G134	A188
R132	R92	R135	R135	H189
A133	A93	I136	I136	A190
S134	D94	N137	N137	K191
A135	R95	P138	P138	E192
W136	196	Y139	Y139	Y193

ES 2 448 815 T3

N137	L97	M140	M140	1194
Q140	T100	P143	P143	F197
Proteína L39E				
N18	XX**	N20	N20	N98
S19	XX	R21	R21	H106
R20	XX	P22	P22	R107
V21	XX	I23	I23	I108
P22	XX	P24	P24	G109
A23	XX	Q25	Q25	D110
Y24	XX	W26	W26	F111
V25	XX	I27	I27	I112
M26	XX	R28	R28	D113
L27	XX	M29	M29	V114
K28	XX	K30	K30	S115
T29	XX	T31	T31	E116
D30	XX	G32	G32	G117
E31	XX	N33	N33	P118
R35	XX	Y37	Y37	H135
N36	XX	N38	N38	N136
H37	XX	S39	S39	L137
K38	XX	K40	K40	Q138
R39	XX	R41	R41	R146
R40	XX	R42	R42	R147
H41	XX	H43	H43	H156
R44	XX	R46	R46	R170
Proteína L29E				
N45	XX	T47	T47	S171

Se determinó que los residuos en la envuelta de 10 angstroms eran aquellos residuos en la subunidad ribosómica 50S que se hallan dentro de 10 angstroms de los átomos de un modelo de péptido recientemente sintetizado posicionado en el centro del túnel de salida, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Se determinaron residuos conservados en 23S ARNr mediante comparación de secuencias de la estructura 23S ARNr^b de *H. marismortui* con las correspondientes secuencias de ADN genómico alineado que codifican el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrial humano^f). En el caso de las proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre las secuencias estructurales de proteínas^g de *H. marismortui* y las correspondientes secuencias de proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E.coli*ⁱ, *rattus norvegicus*^j, humano^k o mitocondrias humanas^l. Las alineaciones de secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) mediante la utilización de parámetros por defecto. *NP significa que no se ha identificado ningún residuo homólogo. ** XX significa que en dichas especies no se ha identificado ninguna proteína homóloga.

a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6(1): 13-27, 36-37.

- b) Número de acceso a Genbank AF034619
- c) Número de acceso a Genbank J01695
- d) Número de acceso a Genbank 2624399
- e) Número de acceso a Genbank M11167
- 5 f) Número de acceso a Genbank 13683
- g) Número de acceso a Genbank P12735 para la proteína L4; número de acceso a Genbank R5HS22 para la proteína L22; número de acceso a Genbank P22452 para la proteína L39E.
- i) Número de acceso a Genbank CAA26461 para la proteína L4; número de acceso a Genbank CAA26465 para la proteína L22; no hay número de acceso a Genbank para la proteína L39E
- 10 j) Número de acceso a Genbank JC4277 para la proteína L4; número de acceso a Genbank P24049 para la proteína L22; número de acceso a Genbank CAA57900 para la proteína L39E.
- k) Números de acceso a Genbank P36578, NP_00959, S39803 y T09551 para la proteína L4; número de acceso a Genbank XP_057521 para la proteína L22; número de acceso a Genbank NP_000991 para la proteína L39E.
- 15 l) Número de acceso a Genbank XP_049502 para la proteína L4; número de acceso a Genbank XP_051279 para la proteína L22; número de acceso a Genbank NP_059142 y NP_542984 para la proteína L39E.

Tabla 8B. Residuos que definen el túnel de salida péptido ribosómico (envuelta 10 Å-15 Å)

Residuo <i>Marismortui</i>	H.	Residuo correspondiente en <i>E-cofi</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
<u>23S ARNr</u>					
U22		U25	G686	G637	NP*
G23		G26	G687	G638	NP
G24		G27	G688	G639	NP
C57		C61	C726	U679	NP
C58		U62	U727	U680	NP
A59		A63	U728	U681	NP
G61		U65	C730	C683	NP
A86		A91	A762	A711	NP
C87		U92	C763	C712	NP
G91		C96	U767	U716	NP
U454		U448	C1104	C1187	NP
C461		C455	C1111	C1194	NP
A463		A457	G1114	G1197	NP
G469		G463	G1120	G1203	NP
U470		U464	C1122	NP	NP
A473		G467	C1125	U120	NP
C474		G468	G1126	C1207	NP
G479		G473	G1131	G1212	NP

ES 2 448 815 T3

C480	G474	C1132	G1213	NP
A485	A479	U1137	A1218	NP
A486	A480	C1138	C1219	NP
G487	G481	C1139	G1220	NP
A489	A483	U1141	G1222	NP
C490	C484	C1142	C1223	NP
C491	C485	C1143	G1224	NP
A495	G489	U1147	C1228	NP
G496	C490	C1148	C1229	NP
G499	G493	G1153	A1235	NP
G512	G506	G1166	G1248	NP
C515	C509	G1169	G1251	NP
C633	U576	G1284	G1365	NP
G634	G577	C1285	C1366	NP
A635	G578	A1286	A1367	NP
G636	G579	A1287	A1368	NP
C637	U580	U1288	U1369	NP
C638	C581	G1289	G1370	NP
C764	C673	C1422	C1500	NP
G765	G674	G1423	G1501	NP
A766	A675	A1424	A1502	NP
G836	G745	G1492	G1571	NP
U837	NP*	A1493	A1572	NP
C838	NP	C1494	C1573	NP
C842	A749	C1498	C1577	NP
A843	A750	A1499	A1578	NP
A846	A753	U1502	U1581	NP
A882	A789	A1538	A1617	NP
U883	U790	U1539	U1618	NP
C884	C791	C1540	C1619	NP
G885	A792	G1541	G1620	NP
C889	C796	C1545	C1624	NP
C890	G797	A1546	A1625	NP
A1358	A1254	A2190	A2326	U350
C1365	C1261	U2197	U2333	A357

ES 2 448 815 T3

C1366	A1262	G2198	G2334	G358
A1367	U1263	G2199	G2335	A359
U1368	A1264	U2200	U2336	U360
A1369	A1265	A2201	A2337	A361
U1419	U1313	U2250	U2386	C407
C1423	G1317	U2254	Y2390	U411
U1432	U1326	C2263	C2399	U419
C1436	C1330	U2267	U2403	U423
A1437	G1331	G2268	G2404	G424
G1438	G1332	A2269	A2405	U425
G1443	G1337	G2274	G2410	C430
G1688	G1613	G2634	G2270	G679
A1691	A1616	G2637	G2773	U682
C1692	C1617	C2638	C2774	A683
A1836	A1780	A3367	A3611	A830
A1839	A1783	U3370	U3614	A833
U2052	U2011	C3583	C3827	U1004
G2053	G2012	G3584	G3828	G1005
G2058	U2017	C3589	C3833	U1010
U2059	G2018	NP	NP	G1011
G2073	G2032	C3603	C3847	G1025
G2097	G2056	A3627	A3871	G1049
C2106	C2065	C3636	C3880	C1058
U2107	C2066	U3637	U3881	U1059
G2284	G2251	G3917	G4156	G1145
G2285	G2252	G3918	G4157	G1146
U2473	U2438	U4105	U4344	U1255
C2475	C2440	C4107	C4346	C1257
C2476	U2441	C4108	C4347	C1258
A2479	G2444	A4111	A4350	A1261
G2480	G2445	G4112	G4351	G1262
U2484	U2449	U4116	U4355	U1266
G2489	G2454	G4121	G4360	G1271
U2528	U2493	U4160	U4399	U1310
G2529	G2494	G4161	G4400	A1311

ES 2 448 815 T3

U2531	C2496	U4163	U4402	G1313
A2532	A2497	C4164	C4403	A1314
C2534	C2499	U4166	U4405	C1316
U2535	U2500	U4167	U4406	U1317
G2543	G2508	G4175	G4414	G1325
G2588	G2553	G4220	G4459	G1370
U2607	A2572	A4239	A4478	A1389
U2610	C2575	U4242	U4481	U1392
A2612	A2577	A4244	A4483	A1394
G2613	G2578	G4245	G4484	U1395
C2614	C2579	C4246	C4485	C1396
U2615	U2580	U4247	U4486	U1397
G2617	G2582	G4249	G4488	A1399
A2622	A2587	A4254	A4493	A1404
C2636	C2601	C4268	C4507	C1418
G2639	U2604	G4271	G4510	G1421
G2642	G2607	A4274	A4513	G1424
G2643	G2608	G4275	G4514	G1425
U2648	U2613	A4280	A4519	U1430
Proteína L4				
T56	T48	T62	T62	E67
P57	R49	S63	R63/S63 ⁿ	S68
A58	A50	A64	A64	L69
R78	A68	H85	H85	P91
R79	R69	R86	R86	R92
V80	S70	S87	S87	L96
Q82	NP	Q89	Q89	Q98
A83	S72	G90	G90	V99
Proteína L4				
V84	I73	A91	A91	A100
K85	K74	F92	F92	M101
Proteína L22				
R19	NP	S20	S20	R72
R21	A10	L22	L22	I74
Q22	R11	R23	R23	K75

ES 2 448 815 T3

V119	G79	A122	A122	G175
G120	P80	P123	P123	P176
S138	K98	S141	S141	Q195
P139	R99	S142	S142	Q196
Proteína L24				
K81	N74	K89	K89	Y95
R83	A76	N91	N91	Y97
G84	T77	G92	G92	I98
E85	G78	T93	T93	G99
Proteína L29				
G37	G35 **	G38	G38	XX
G38	NP	G39	G39	XX
A39	Q36	A40	A40	XX
P40	L37	A41	A41	XX
E41	Q38	S42	S42	XX
P43	S40	L44	L44	XX
Proteína L37E				
G4	XX	G4	G4	XX
T5	XX	T5	T5	XX
Proteína L39E				
L14	XX	K16	K16	K94
D15	XX	Q17	Q17	A95
N16	XX	K18	K18	S96
Q17	XX	Q19	Q19	Q97
W24	XX	W26	W26	F111
W42	XX	W44	W44	L157
R43	XX	R45	R45	R158
Proteína L39E				
D46	XX	K48	K48	R172

5 Se determinó que los residuos en la envuelta de 10-15 angstroms eran aquellos residuos en la subunidad ribosómica 50S que se hallan dentro de 10 - 15 angstroms de los átomos de un modelo de péptido recientemente sintetizado posicionado en el centro del túnel de salida, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Se determinaron residuos conservados en 23S ARNr mediante comparación de secuencias de la estructura 23S ARNr^b de *H. marismortui* con las correspondientes secuencias de ADN genómico alineado que codifican el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrial humano^f). En los casos de las proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre la secuencia estructural de proteína^g de *H. marismortui* y las correspondientes secuencias de proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E.coli*ⁱ, *rattus norvegicus*^j, humano^k o mitocondrias humanas^l. Las alineaciones de secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) mediante la utilización de parámetros por defecto. *NP significa que no se ha identificado ningún residuo homólogo. ** XX significa que en dichas especies no se ha identificado ninguna proteína homóloga.

10

- a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6(1): 13-27, 36-37.
- b) Número de acceso a Genbank AF034619B
- c) Número de acceso a Genbank J01695
- 5 d) Número de acceso a Genbank 2624399
- e) Número de acceso a Genbank M11167
- f) Número de acceso a Genbank 13683
- g) Número de acceso a Genbank P12735 para la proteína L4; número de acceso a Genbank R5HS22 para la proteína L22; número de acceso a Genbank R5HS22 para la proteína L24; número de acceso a Genbank R5HS29 para la proteína L29; número de acceso a Genbank P32410 para la proteína L37E; número de acceso a Genbank P22452 para la proteína L39E.
- 10 i) Número de acceso a Genbank CAA26461 para la proteína L4; número de acceso a Genbank CAA26465 para la proteína L22; número de acceso a Genbank R5EC24 para la proteína L24; número de acceso a Genbank R5EC29 para la proteína L29; no hay Número de acceso a Genbank para la proteína L37E; no hay Número de acceso a Genbank para la proteína L39E.
- 15 j) Número de acceso a Genbank JC4277 para la proteína L4; número de acceso a Genbank P24049 para la proteína L22; número de acceso a Genbank P12749 para la proteína L24; número de acceso a Genbank R5RT35 para la proteína L29; número de acceso a Genbank CAA47012 para la proteína L37E; número de acceso a Genbank CAA57900 para la proteína L39E.
- 20 k) Números de acceso a Genbank P36578, NP_00959, S39803, y T09551 para la proteína L4; número de acceso a Genbank XP_057521 para la proteína L22; número de acceso a Genbank AAA60279 y NP_000978 para la proteína L24; número de acceso a Genbank AAA51648 para la proteína L29; número de acceso a Genbank NP_000988 para la proteína L37E; número de acceso a Genbank NP_000991 para la proteína L39E.
- l) Número de acceso a Genbank XP_049502 para la proteína L4; número de acceso a Genbank XP_051279 para la proteína L22; número de acceso a Genbank XP_056380 para la proteína L24; no hay Número de acceso a Genbank para la proteína L29; no hay Número de acceso a Genbank para la proteína L37E; número de acceso a Genbanks NP_059142 y NP_542984 para la proteína L39E.
- 25 n) R63 se halla presente en las secuencias GenBank T09551 y S39803, mientras que S63 se halla presente en las secuencias GenBank P36578 y NP_000959
- 30 La Figura 30 muestra una región de la gran subunidad ribosómica en la que se liga un antibiótico. La Figura 30(A) muestra una porción ampliada de la gran subunidad ribosómica con el antibiótico tilosina unido en la parte superior del túnel de salida de polipéptido adyacente al sitio de peptidiltransferasa. Las Figuras 30(B) y 30(C) son vistas que muestran cada mitad de una gran subunidad ribosómica cortada a lo largo del túnel de salida de polipéptido y tienen por objeto orientar al lector para mostrar el sitio de unión de la tilosina con respecto a la gran subunidad ribosómica como un todo. La Figura 30(A) también muestra dos cavidades definidas por la pared del túnel de salida de polipéptido que llevan la designación de "cavidad 1" y "cavidad 2". Además, la Figura 30(A) también muestra un bolsillo de unión de disacárido. La dirección en la que las cadenas de polipéptido recién sintetizadas egresan de la ribosoma a través del túnel de salida de polipéptido está indicada mediante una flecha.
- 35 La Tabla 9 identifica los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen una primera cavidad dentro de la pared del túnel de salida de polipéptido (cavidad 1). Además, la Tabla 9 identifica cuáles de los residuos definen residuos correspondientes de la cavidad 1 en *E. coli*, *Rattus*, *humano* y de mitocondrias humanas. Los residuos no conservados han sido identificados como anteriormente descrito con respecto a las Tablas 5A y 5B.
- 40

Tabla 9. Residuos que definen la cavidad 1 en el túnel de salida de péptido ribosómico

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-resp.en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
<u>23S ARNs</u>				
C474	G468	G1126	C1207	NP*
A766	A675	A1424	A1502	NP

ES 2 448 815 T3

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-rresp.en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
A767	A676	A1425	A1503	NP
U768	A677	A1426	A1504	NP
U883	U790	U1539	U1618	NP
C884	C791	C1540	C1619	NP
G885	A792	G1541	G1620	NP
A886	A793	A1542	A1621	NP
U888	C795	C1544	C1623	NP
C889	C796	C1545	C1624	NP
C890	G797	A1546	A1625	NP
U1359	U1255	U2191	U2327	U351
G1837	U1781	A3368	A3612	C831
A2100	A2059	A3630	A3874	A1052
A2101	A2060	A3631	A3875	A1053
G2102	G2061	G3632	G3876	G1054
A2103	A2062	A3633	A3877	A1055
C2475	C2440	C4107	C4346	C1257
C2476	U2441	C4108	C4347	C1258
C2477	C2442	A4109	A4348	C1259
U2478	C2443	C4110	C4349	U1260
A2479	G2444	A4111	A4350	A1261
A2538	A2503	A4170	A4409	A1320
Proteina L4				
P57	R49	S63	R63/S63n	S68
A58	A50	A64	A64	L69
E59	E51	E65	E65	R70
S60	V52	S66	S66	G71
F61	T53	W67	W67	F72
G62	G54	G68	G68	E73
S63	S55	T69	T69	Q74
G64	G56	G70	G70	E75
R65	K57	R71	R71	R76
Q67	NP*	V73	V73	L79
V70	P59	176	176	L82

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-rresp.en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
P71	W60	P77	P77	H83
Proteína L4				
K72	R61	R78	R78	P84
L73	Q62	V79	V79	D85
D74	G64	G81	G81	F87
G75	T65	G82	G82	A88
R76	G66	G83	G83	T89

Se identificaron los residuos de las cavidades, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Se determinaron residuos conservados en 23S ARNr mediante comparación de secuencias de la estructura 23S ARNr^b de *H. marismortui* con las correspondientes secuencias de ADN genómico alineado que codifican el 23S ARNr homólogo^b (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f). En los casos de las proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre la secuencia estructural de proteína^g de *H. marismortui* y las correspondientes secuencias de proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E. coli*^h, *rattus norvegicus*ⁱ, humano^k o mitocondrias humanas^l. Las alineaciones de secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.). *NP significa que no se ha identificado ningún residuo homólogo.

5 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis y R. Langridge. (1988). "The MIDAS Display System," J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27, 36-37.

10 b) Número de acceso a Genbank AF034619

c) Número de acceso a Genbank J01695

d) Número de acceso a Genbank 2624399

e) Número de acceso a Genbank M11167

15 f) Número de acceso a Genbank 13683

g) Número de acceso a Genbank P12735 para la proteína L4.

i) Número de acceso a Genbank CAA26461 para la proteína L4.

j) Número de acceso a Genbank JC4277 para la proteína L4.

k) Números de acceso a Genbank P36578, NP_00959, S39803 y T09551 para la proteína L4.

20 l) Número de acceso a Genbank XP_049502 para la proteína L4.

n) R63 se halla presente en las secuencias de GenBank T09551 y S39803 mientras que S63 se halla presente en las secuencias de GenBank P36578 y NP_000959.

25 En la Tabla 10 se identifican los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen una segunda cavidad en la pared del túnel de salida de polipéptido (cavidad 2). Además, la Tabla 10 identifica cuáles de aquellos residuos definen correspondientes residuos de la cavidad 2 en *E. coli*, *Rattus*, humano, y mitocondrias humanas. Los residuos no conservados fueron identificados como anteriormente descrito con respecto a las Tablas 5A y 5B.

Tabla 10. Residuos que definen la cavidad 2 en el túnel de salida de péptido ribosómico

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-rresp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
<u>23S ARNs</u>				
U831	C740	U1488	U1567 *	NP
U832	U741	C1489	C1568	NP

ES 2 448 815 T3

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-rresp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
G833	A742	C1490	C1569	NP
G834	A743	NP	NP	NP
U835	U744	U1491	U1570	NP
G836	G745	G1492	G1571	NP
U837	NP	A1493	A1572	NP
C838	NP	C1494	C1573	NP
C839	U746	G1495	G1574	NP
U840	U747	U1496	U1575	NP
A841	G748	G1497	G1576	NP
A843	A750	A1499	A1578	NP
A844	A751	A1500	A1579	NP
U845	A752	A1501	A1580	NP
A846	A753	U1502	U1581	NP
C847	U754	C1503	C1582	NP
C848	U755	G1504	G1583	NP
C849	A756	G1505	G1584	NP
C1753	C1675	C2695	C2833	NP
A1754	A1676	A2696	A2834	U734
G1837	U1781	A3368	A3612 C	831
U1838	U1782	U3369	U3613	C832
A1839	A1783	U3370	U3614	A833
G2099	A2058	G3629	G3873	G1051
A2100	A2059	A3630	A3874	A1052
A2103	A2062	A3633	A3877	A1055
U2615	U2580	U4247	U4486	U1397
G2616	G2581	G4248	G4487	G1398
U2621	U2586	U4253	U4492 C	1403
A2622	A2587	A4254	A4493	A1404
G2643	G2608	G4275	G4514	G1425
C2644	U2609	U4276	U4515	U1426
U2645	C2610	U4277	U4516	U1427
G2646	C2611	U4278	U4517	U1428
C2647	C2612	U4279	U4518	C1429

Se identificaron los residuos de las cavidades mediante el programa MIDAS^a. Se determinaron los residuos conservados en 23S ARNr mediante comparación de secuencias de la estructura 23S ARNr ^bde *H. marismortui* con las correspondientes secuencias de ADN genómico alineado que codifican el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondria humana^f). Las alineaciones de secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.).*NP significa que no se ha identificado ningún residuo homólogo.

a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6(1): 13-27, 36-37.

b) Número de acceso a Genbank AF034619

c) Número de acceso a Genbank J01695

d) Número de acceso a Genbank 2624399

e) Número de acceso a Genbank M11167

f) Número de acceso a Genbank 13683

Sin embargo, las Tablas 9 y 10 definen solamente dos de muchas cavidades dispuestas dentro de la pared del túnel de salida de polipéptido. Sin embargo, mediante la utilización de coordenadas atómicas y de las metodologías de modelación nuclear descritos en la presente, el experto en el arte puede identificar los residuos (aportados por aminoácidos, nucleótidos o una combinación de ambos) que conjuntamente definen otras cavidades dentro de la pared del túnel de salida de polipéptido.

Además, gracias a la utilización de las coordenadas atómicas descritas en la presente, el experto en el arte puede identificar el sitio de unión de antibiótico, de cualquier antibiótico de interés. Esta información también provee sitios de contacto entre un antibiótico y los residuos en una ribosoma o subunidad ribosómica, que puede utilizarse de manera ventajosa en el diseño de inhibidores, novedosos o modificados, de las proteínas. Los sitios de unión o de contacto para una variedad de antibiótico se exponen con mayor detalle en lo que sigue.

La Tabla 11A identifica los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen por lo menos una porción de un bolsillo de unión de anisomicina (envuelta 5,8 angstroms). Además, la Tabla 11A identifica los correspondientes residuos que definen por lo menos una porción del bolsillo de unión de anisomicina en *E. coli*, *Rattus*, *humano*, y subunidad grande de mitocondrias humanas. En la Tabla 11B se identifican los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen una porción más amplia de un bolsillo de unión de anisomicina (envuelta de 5,8 – 12,6 angstroms). Los residuos no conservados han sido identificados como anteriormente descrito con respecto a las Tablas 5A y 5B.

Tabla 11A. Residuos que definen el bolsillo de unión de anisomicina (envuelta de 5,8 Å)

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co- resp. en <i>E.coli</i>	Residuo corres- pondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspon- diente en humano	Residuo correspon- diente en mitocondrias humanas
<u>23S ARNs</u>				
A2100 ^v	A2059	A3630	A3874	A1052
G2102 ^v	G2061	G3632	G3876	G1054
A2103 ^v	A2062	A3633	A3877	A1055
G2482 ^v	G2447	G4114	G4353	G1264
A2486 ^v	A2451	A4118	A4357	A1268
C2487 ^{h,v}	C2452	C4119	C4358	C1269
A2488 ^v	A2453	U4120	U4359	U1270
U2535 ^{h,v}	U2500	U4167	U4406	U1317
C2536	C2501	C4168	C4407	C1318
A2538 ^v	A2503	A4170	A4409	A1320
U2539 ^{h,v}	U2504	U4171	U4410	U1321

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-rresp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
G2540 ^v	G2505	G4172	G4411	G1322
U2541 ^v	U2506	U4173	U4412	U1323
U2629 ^v	U2585	U4552	U4991	U1402

Se determinó que los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta de 5,8 angstroms) son aquellos residuos en la subunidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8 angstroms de los átomos de anisomicina, mediante el programa MIDAS^a. Se determinaron los residuos conservados en 23S ARNr mediante comparación de secuencias de la estructura 23S ARNr^b de *H. marismortui* con las correspondientes secuencias de ADN genómico alineado que codifican el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondria humana^f). Las alineaciones de secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) con parámetros por defecto.

- 5 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6(1): 13-27,36-37.
- 10 b) Número de acceso a Genbank AF034619
- c) Número de acceso a Genbank J01695
- d) Número de acceso a Genbank 2624399
- e) Número de acceso a Genbank M11167
- f) Número de acceso a Genbank 13683
- 15 h) Indica un residuo que se halla dentro de la distancia de unión del hidrógeno (3.5 angstroms) del ligando; por ejemplo ver Jorgensen, WL, Nguyen, TB. J. Comput. Chem. (1993) 14:195-205.
- v) los residuos en contacto de van der Waals con el antibiótico se definen como aquellos residuos dentro de r_{min} de cualquier átomo en el antibiótico, en donde $r_{min} = 21/6s$ y es el mínimo en el potencial de pares de Lennard-Jones (ver: Computer Simulation of Liquids; Allen, M. P. y Tildesley, D. J.; Oxford University Press: New York, 1992, 11.).
- 20 Los ss de Lennard-Jones se toman del campo de fuerzas de OPLS-AA (véase, por ejemplo Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S. y Tirado-Rives, J. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 11225-11236 y Jorgensen, W. L. BOSS, Versión 4.3; Yale University: New Haven, CT, 2002).

Tabla 11B Residuos que definen el bolsillo de unión de anisomicina (envuelta de 5,8 Å-12,6 Å)

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-rresp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
<u>23S ARNs</u>				
A631	A574	G1282 *	G1363	NP
A632	A575	C1283	C1364	NP
C633	U576	G1284	G1365	NP
G2073	G2032	C3603	C3847	G1025
A2095	A2054	G3625	G3869	A1047
A2096	C2055	A3626	A3870	C1048
G2097	G2056	A3627	A3871	A1049
C2098	G2057	A3628	A3872	A1050
G2099	A2058	G3629	G3873	G1051
G2102	G2061	G3632	G3876	G1054

ES 2 448 815 T3

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-rresp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
C2104	C2063	C3634	C3878	C1056
C2105	C2064	C3635	C3879	C1057
A2474	A2439	A4106	A4345	A1256
G2481	G2446	G4113	G1263	G4352
U2484	U2449	U4116	U4355	U1266
A2485	A2450	A4117	A4356	A1267
G2489	G2454	G4121	G4360	G1271
A2490	G2455	G4122 C	G4361	1272
A2532	A2497	C4164	C4403	A1314
C2533	C2498	C4165	C4404	C1315
C2534	C2499	U4166	U4405	C1316
G2537	G2502	G4169	G4408	G1319
C2542	C2507	C4174	C4413	U1324
G2543	G2508	G4175	G4414	G1325
G2588	G2553	G4220	G4459	G1370
U2607	A2572	A4239	A4478	C1389
C2608	C2573	C4240	C4479	C1390
G2609	G2574	G4241	G4480	G1391
U2610	C2575	U4242	U4481	U1392
C2611	G2576	G4243	G4482	G1393
A2612	A2577	A4244	A4483	A1394
G2618	G2583	G4250	G4489	G1400
U2619	U2584	U4251	U4490	U1401
A2637	A2602	A4269	A4508	A1419
G2646	C2611	U4278	U4517	U1428
L3				
W242	Q150	W257	W257	G246

Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta 5,8 Å-12,6 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la subunidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8-12,6 angstroms de los átomos de anisomisina para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados fueron determinados mediante comparación entre las estructuras secundarias propuestas de *H. marismortui*^b, *E. coli*^b, y *Rattus norvegicus*^c, humano^d, y mitocondria humana^e. Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) con el uso de parámetros por defecto. *NP significa que no se identificaron residuos homólogos.

5

a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6(1): 13-27, 36-37.

b) Número de acceso a Genbank AF034619

- c) Número de acceso a Genbank J01695
 d) Número de acceso a Genbank 2624399
 e) Número de acceso a Genbank M11167
 f) Número de acceso a Genbank 13683
 5 g) Número de acceso a Genbank AAA86859 para la proteína L3.
 i) Número de acceso a Genbank CAA26460 para la proteína L3.
 k) Número de acceso a Genbank NP_000964 para la proteína L3.
 l) Número de acceso a Genbank P09001 para la proteína L3

10 La Tabla 12A identifica los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen por lo menos una porción de un bolsillo de unión de blastidina (envuelta 5,8 angstroms). Además, la Tabla 12A identifica los correspondientes residuos que definen por lo menos una porción del bolsillo de unión de blastidina en *E. coli*, *Rattus*, *humano*, y subunidad grande de mitocondrias humanas. En la Tabla 12B se identifican los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen una porción más amplia de un bolsillo de unión de blastidina (envuelta de 5,8 – 12,6 angstroms). Los residuos no conservados han sido identificados como
 15 anteriormente descrito con respecto a las Tablas 5A y 5B.

Tabla 12A. Residuos que definen el bolsillo de unión de blastidina (envuelta de 5,8 Å)

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-rresp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
<u>23S ARNs</u>				
C2106 ^v	C2065	C3636	C3880	C1058
G2284 ^{h,v}	G2251	G3917	G4156	G1145
G2285 ^{h,v}	G2252	G3918	G4157	G1146
G2286 ^{h,v}	G2253	G3919	G4158	G1147
C2287 ^v	C2254	C3920	C4159	C1148
A2007 ^v	A1966	A3538	A3782	A959
C2104 ^v	C2063	C3634	C3878	C1056
C2105 ^{h,v}	C2064	C3635	C3879	C1057
U2473 ^v	U2438	U4105	U4344	U1255
A2474 ^{h,v}	A2439	A4106	A4345	A1256
A2485 ^v	A2450	A4117	A1267	A4356
A2486 ^v	A2451	A4118	A1268	A4357
U2620 ^v	U2585	U4252	U4491	U1402
G2627 ^v	G2592	G4259	G4498	G1409
U2628 ^v	U2593	U4260	U4499	G1410
C2629 ^v	C2594	C4261	C4500	A1411
G2634 ^v	G4266	G2599	G4505	U1416
A2635 ^{h,v}	A2600	A4267	A4506	C1417
C2636 ^{h,v}	C2601	C4268	C4507	C1418

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-resp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
A2637 ^v	A2602	A4269	A4508	A1419

5 Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta de 5,8 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la subunidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8 angstroms con respecto a los átomos de blastidina, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr fueron determinados mediante comparación de las secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr^b con las correspondientes secuencias del ADN genómico alineado que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias^d humanas^f). Las alineaciones de las secuencia fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) mediante la utilización de parámetros por defecto.

10 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27, 36-37.

b) Número de acceso a Genbank AF034619

c) Número de acceso a Genbank J01695

d) Número de acceso a Genbank 2624399

e) Número de acceso a Genbank M11167

15 f) Número de acceso a Genbank 13683

h) Indica el residuo que se halla dentro de la distancia de unión del hidrógeno (3,5 angstroms) del ligando, por ejemplo, ver Jorgensen, WL, Nguyen, TB. (1993) J. Comput. Chem. 14:195-205.

20 v) los residuos en contacto de van der Waals con el antibiótico se definen como aquellos residuos dentro de r_{min} de cualquier átomo en el antibiótico, en donde $r_{min} = 21/6s$ y es el mínimo en el potencial de pares de Lennard-Jones (ver: Computer Simulation of Liquids; Allen, M. P. y Tildesley, D. J.; Oxford University Press: New York, 1992, 11.). Los ss de Lennard-Jones se toman del campo de fuerzas de OPLS-AA (véase, por ejemplo Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S. y Tirado-Rives, J. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 11225-11236 y Jorgensen, W. L. BOSS, Versión 4.3; Yale University: New Haven, CT, 2002).

Tabla 12B. Residuos que definen el bolsillo de unión de blastidina (envuelta de 5,8 – 12,6 Å)

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-resp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
G885	A792	G1541	G1620	NP*
U1980	U1939	U3511	U3755	U932
A1981	U1940	G3512	G3756	C933
C1982	C1941	C3513	C3757	A934
C2006	C1965	C3537	C3781	U958
U2008	C1967	U3539	U3783	U960
G2102	G2061	G3632	G3876	G1054
A2103	A2062	A3633	A3877	A1055
U2107	C2066	U3637	U3881	U1059
G2110	G2069	U3640	U3884	G1062
G2111	A2070	G3641	G3885	NP

ES 2 448 815 T3

A2112	A2071	A3642	A3886	NP
G2113	C2072	G3643	G3887	NP
C2114	C2073	C3644	C3888	NP
U2282	U2249	U3915	U4154	U1143
G2283	G2250	G3916	G4155	G1144
G2288	G2255	G3921	G4160	G1149
G2289	G2256	G3922	G4161	A1150
G2471	G2436	G4103	G4342	G1253
C2472	G2437	U4104	U4343	U1254
C2475	C2440	C4107	C4346	C1257
C2476	U2441	C4108	C4347	C1258
C2477	C2442	A4109	A4348	C1259
U2478	C2443	C4110	C4349	U1260
G2481	G2446	G4113	G4352	G1263
G2482	G2447	G4114	G4353	G1264
U2484	U2449	U4116	U4355	U1266
C2487	C2452	C4119	C4358	C1269
G2529	G2494	G4161	G4400	A1311
C2530	G2495	A4162	A4401	C1312
U2531	C2496	U4163	U4402	G1313
A2532	A2497	C4164	C4403	A1314
C2536	C2501	C4168	C4407	C1318
U2619	U2584	U4251	U4490	U1401
U2621	U2586	U4253	U4492	C1403
A2622	A2587	A4254	A4493	A1404
G2623	G2588	G4255	G4494	G1405
A2624	A2589	A4256	A4495	A1406
C2625	A2590	C4257	C4496	C1407
G2630	G2595	G4262	G4501	G1412
A2633	A2598	A4265	A4504	A1415
G2638	G2603	G4270	G4509	G1420
G2639	U2604	G4271	G4510	G1421
U2640	U2605	U4272	U4511	U1422
G2642	G2607	A4274	A4513	G1424
G2643	G2608	G4514	G4275	G1425

Proteína L2				
G204	G235	G214	G214	W281
G205	E236	N215	N215	A282
R206	G237	H216	H216	G283
Proteína L10E				
D109	XX**	T113	T113	XX
G110	XX	G114	G114	XX
M111	XX	M115	M115	XX
R112	XX	R116	R116	XX

5 Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta 5,8 Å-12,6 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la subunidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8-12,6 angstroms de los átomos de blastidina, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr fueron determinados mediante comparación de secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr^b con las secuencias correspondientes de ADN genómico alineado que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f). En los casos de proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre la secuencia estructural de proteína de *H. marismortui*^g y las correspondientes secuencias de proteína alineadas que codifica proteínas homólogas en *E. coli*ⁱ, *Rattus norvegicus*^j, humano^k o mitocondrias humanas. Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas mediante el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) para lo cual se utilizaron parámetros por defecto. *NP significa que no se identificaron residuos homólogos. ** XX significa que no se identificó proteína homóloga en dicha especie.

- 10 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1): 13-27, 36-37.
- 15 b) Número de acceso a Genbank AF034619
- c) Número de acceso a Genbank J01695
- d) Número de acceso a Genbank 2624399
- e) Número de acceso a Genbank M11167
- f) Número de acceso a Genbank 13683
- 20 g) Número de acceso a Genbank RSHS2L para la proteína L2; número de acceso a Genbank 15825950 para la proteína L10E.
- i) Número de acceso a Genbank CAA26463 para la proteína L2; No hay Número de acceso a Genbank para la proteína L10E.
- 25 j) Número de acceso a Genbank R5RTL8 para la proteína L2; número de acceso a Genbank NP_112362 para la proteína L10E.
- k) Número de acceso a Genbank NP_000964 para la proteína L2; número de acceso a Genbank NP_006004 para la proteína L10E.
- l) Número de acceso a Genbank XP_004140 para la proteína L2; no hay Número de acceso a Genbank para la proteína L10E
- 30 La Tabla 13A identifica los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen por lo menos una porción de un bolsillo de unión de carbomicina (envuelta 5,8 angstroms). Además, la Tabla 13A identifica los correspondientes residuos que definen por lo menos una porción del bolsillo de unión de carbomicina en *E. coli*, *Rattus*, humano, y subunidad grande de mitocondrias humanas. En la Tabla 13B se identifican los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen una porción más amplia de un bolsillo de unión de carbomicina (envuelta de 5,8 – 12,6 angstroms). Los residuos no conservados han sido
- 35 identificados como anteriormente descrito con respecto a las Tablas 5A y 5B.

Tabla 13A. Residuos que definen el bolsillo de unión de carbomicina (envuelta de 5,8 Å)

Residuo <i>H. marismortui</i>	Residuo co-rresp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
C839 ^v	U746	G1495	G1574	NP*
C2098 ^v	G2057	A3628	A3872	A1050
G2099 ^{h,v}	A2058	G3629	G3873	G1051
A2100	A2059	A2630	A3874	A1052
G2102 ^{h,v}	G2061	G3632	G3876	G1054
A2103 ^{h,v}	A2062	A3633	A3877	A1055
C2104	C2063	C3634	C3878	C1056
A2486 ^v	A2451	A4118	A4357	A1268
C2487 ^v	C2452	C4119	C4358	C1269
A2538 ^{h,v}	A2503	A4170	A4409	A1320
U2539 ^{m,v}	U2504	U4171	U4410	U1321
G2540 ^{h,v}	G2505	G4172	G4411	G1322
U2541 ^v	U2506	U4173	U4412	U1323
U2620 ^v	U2585	U4252	U4491	U1402
C2644 ^v	U2609	U4276	U4515	A1426
G2646 ^v	C2611	U4278	U4517	U1428
Proteína L22				
M130 ^v	K90	H133	H133	V187

5 Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta de 5,8 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la subunidad ribosómica 50S ribosómico que están situados dentro de 5,8 angstroms con respecto a los átomos de carbomicina A para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr fueron determinados mediante la comparación de secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr^b con las secuencias correspondientes de ADN genómico alineado que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, *humano*^e o mitocondrias humanas. En el caso de proteínas ribosómicas, también se efectuaron entre las secuencias estructurales de proteínas de *H. marismortui* y las correspondientes secuencias de secuencias de proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E. coli*^f, *Rattus norvegicus*^g, *humano*^k o mitocondrias humanas^l. Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas mediante el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) con parámetros por defecto. *NP significa que no se identificó ningún residuo homólogo.

15 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27, 36-37.

b) Número de acceso a Genbank AF034619

c) Número de acceso a Genbank J01695

d) Número de acceso a Genbank 2624399

e) Número de acceso a Genbank M11167

20 f) Número de acceso a Genbank 13683 g) Número de acceso a Genbank R5HS22 para la proteína L22.

h) Indica el residuo que se halla dentro de la distancia de unión del hidrógeno (3,5 Å) del ligando, por ejemplo, ver Jorgensen, WL, Nguyen, TB. (1993) J. Comput. Chem. 14:195-205.

i) Número de acceso a Genbank CAA26465 para la proteína L22.

j) Número de acceso a Genbank P24049 para la proteína L22.

5 k) Número de acceso a Genbank XP_057521 para la proteína L22.

l) Número de acceso a Genbank Up_051279 para la proteína L22.

m) Este residuo se halla en realidad a 5,85 Å.

10 v) Los residuos en contacto de van der Waals con el antibiótico se definen como aquellos residuos dentro de r_{min} de cualquier átomo en el antibiótico, en donde $r_{min} = 21/6s$ y es el mínimo en el potencial de pares de Lennard-Jones (ver: Computer Simulation of Liquids; Allen, M. P. y Tildesley, D. J.; Oxford University Press: New York, 1992, 11.). Los σ de Lennard-Jones se toman del campo de fuerzas de OPLS-AA (véase, por ejemplo Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S. y Tirado-Rives, J. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 11225-11236 y Jorgensen, W. L. BOSS, Versión 4.3; Yale University: New Haven, CT, 2002).

Tabla 13B. Residuos que también definen el bolsillo de unión de carbomicina A

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-resp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
C633	U576	G1284	G1365	NP
U835	U744	U1491	U1570	NP
G836	G745	G1492	G1571	NP
U837	NP	A1493	A1572	NP
C838	NP	C1494	C1573	NP
U840	U747	U1496	U1575	NP
A841	G748	G1497	G1576	NP
A843	A750	A1499	A1578	NP
A844	A751	A1500	A1579	NP
U845	A752	A1501	A1580	NP
A846	A753	U1502	U1581	NP
A882	A789	A1538	A1617	NP
U883	U790	U1539	U1618	NP
U1359	U1255	U2192	U2327	U351
G1837	U178	A3368	A3612	C831
U1838	U1782	U3369	U3613	C832
C2056	A2015	A3587	A3831	A1008
U2057	U2016	C3588	C3832	U1009
G2073	G2032	C3603	C3847	G1025
A2095	A2054	G3625	G3869	A1047
A2096	C2055	A3626	A3870	C1048

ES 2 448 815 T3

G2097	G2056	A3627	A3871	G1049
A2101	A2060	A3631	A3875	A1053
C2105	C2064	C3635	C3879	C1057
A2474	A2439	A4106	A4345	A1256
C2476	U2441	C4108	C4347	C1258
C2477	C2442	A4109	A4348	C1259
U2478	C2443	C4110	C4349	U1260
G2481	G2446	G4113	G4352	G1263
G2482	G2447	G4114	G4353	G1264
A2485	A2450	A4117	A4356	A1267
A2488	A2453	U4120	U4359	A1270
G2489	G2454	G4121	G4360	G1271
U2534	C2499	U4166	U4405	C1316
U2535	U2500	U4167	U4406	U1317
C2536	C2501	C4168	C4407	C1318
G2537	G2502	G4169	G4408	G1319
C2542	C2507	C4174	C4413	U1324
G2543	G2508	G4175	G4414	G1325
U2607	A2572	A4239	A4478	A1389
C2608	C2573	C4240	C4479	C1390
U2610	C2575	U4242	U4481	U1392
G2611	G2576	G4243	G4482	G1393
A2612	A2577	A4244	A4483	A1394
C2614	C2579	C4246	C4485	C1396
U2615	U2580	U4247	U4486	U1397
G2616	G2581	G4248	G4487	G1398
G2618	G2583	G4250	G4489	G1400
U2619	U2584	U4251	U4490	U1401
U2621	U2586	U4253	U4492	C1403
A2622	A2587	A4254	A4493	A1404
A2637	A2602	A4269	A4508	A1419
G2643	G2608	G4275	G4514	G1425
U2645	C2610	U4277	U4516	U1427
C2647	C2612	U4279	U4518	U1429
L3				

W242	Q150	W257	W257	G246
L4				
G62	G54	G68	G68	E73
S63	S55	T69	T69	Q74
G64	G56	G70	G70	E75
R65	K57	R71	R71	R76
G66	NP	A72	A72	G78
Q67	NP	V73	V73	L79
A129	A89	A132	A132	A186
G131	G91	G134	G134	A188
L4				
R132	R92	R135	R135	H189

5 Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta de 5,8 Å-12,6 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la subunidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8-12,6 angstroms de los átomos de carbomicina A, para lo cual se utilizó MTDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr fueron determinados mediante la comparación de secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr^b con las secuencias correspondientes de ADN genómico que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f). En los casos de proteínas ribosómicas, también se hicieron comparaciones entre la secuencia estructural de la proteína de *H. marismortui* y las correspondientes secuencias de proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E. coli*ⁱ, *Rattus norvegicus*^j, humano^k o mitocondrias humanas^l. Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas mediante el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) para lo cual se utilizaron parámetros por defecto. *NP significa que no se identificaron residuos homólogos.

10 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27, 36-37.

b) Número de acceso a Genbank AF034619

15 c) Número de acceso a Genbank J01695

d) Número de acceso a Genbank 2624399

e) Número de acceso a Genbank M11167

f) Número de acceso a Genbank 13683

20 g) Número de acceso a Genbank AAA86859 para la proteína L3; número de acceso a Genbank P12735 para la proteína L4.

i) Número de acceso a Genbank CAA26460 para la proteína L3; número de acceso a Genbank CAA26461 para la proteína L4.

j) Número de acceso a Genbank P21531 para la proteína L3; número de acceso a Genbank JC4277 para la proteína L4.

25 k) Número de acceso a Genbank NP_000958 para la proteína L3; número de acceso a Genbanks P36578, NP_000959, S39803, y T09551 para la proteína L4.

l) Número de acceso a Genbank P09001 para la proteína L3; número de acceso a Genbank XP_049502 para la proteína L4

30 La Tabla 14A identifica los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen por lo menos una porción de un bolsillo de unión de tilosina (envuelta 5,8 angstroms). Además, la Tabla 13A identifica los correspondientes residuos que definen por lo menos una porción del bolsillo de unión de tilosina en *E. coli*, *Rattus*, humano, y subunidad grande de mitocondrias humanas. En la Tabla 14B se identifican los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen una porción más amplia de un bolsillo de

unión de tilosina (envuelta de 5,8 – 12,6 angstroms). Los residuos no conservados han sido identificados como anteriormente descrito con respecto a las Tablas 5A y 5B.

Tabla 14A. Residuos que definen el bolsillo de unión de tilosina (envuelta de 5,8 Å)

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co- rresp. en <i>E. coli</i>	Residuo corres- pondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspon- diente en humano	Residuo correspon- diente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
C839 ^v	U746	G1495	G1574	NP*
A841 ^{h,v}	G748	G1497	G1576	NP
A843 ^v	A750	A1499	A1578	NP
A844 ^{h,v}	A751	A1500	A1579	NP
U845 ^v	A752	A1501	A1580	NP
A846 ^v	A753	U1502	U1581	NP
G1837	U1781	A3368	A3612	C831
C2098 ^v	G2057	A3628	A3872	A1050
G2099 ^{h,v}	A2058	G3629	G3873	G1051
A2100 ^v	A2059	A3630	A3874	A1052
G2102 ^v	G2061	G3632	G3876	G1054
A2103 ^{h,v}	A2062	A3633	A3877	A1055
A2486 ^v	A2451	A4118	A4357	A1268
A2538 ^{h,v}	A2503	A4170	A4409	A132
U2539 ^v	U2504	U4171	U4410	U1321
G2540 ^v	G2505	G4172	G4411	G1322
U2541	U2506	U4173	U4412	U1323
U2620 ^{m,v}	U2585	U4252	U4491	U1402
C2644 ^v	U2609	U4276	U4515	U1426
U2645 ^v	C2610	U4277	U4516	U1427
G2646 ^v	C2611	U4278	U4517	U1428
Proteína L22				
M130 ^v	K90	H133	H133	V187

5 Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta de 5,8 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la subunidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8 angstroms con respecto a los átomos de tilosina, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr fueron determinados mediante la comparación de secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr^p con las secuencias correspondientes de ADN genómico que codifican el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^f, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^l). En los casos de proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre la secuencia estructural de la proteína de *marismortui*^g y las correspondientes secuencias de proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E. coli*^f, *Rattus norvegicus*^l, humano^k o mitocondrias humanas^l. Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) para lo cual se utilizaron parámetros por defecto. *NP significa que no se identificaron residuos homólogos.

10

15 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27,36-37.

- b) Número de acceso a Genbank AF034619
- c) Número de acceso a Genbank J01695
- d) Número de acceso a Genbank 2624399
- e) Número de acceso a Genbank M11167
- 5 f) Número de acceso a Genbank 13683
- g) Número de acceso a Genbank R5HS22 para la proteína L22.
- h) Indica el residuo que se halla dentro de la distancia de unión del hidrógeno (3,5 Å) del ligando, por ejemplo, ver Jorgensen, WL, Nguyen, TB. (1993) J. Comput. Chem. 14:195-205.
- i) Número de acceso a Genbank CAA26465 para la proteína L22.
- 10 j) Número de acceso a Genbank P24049 para la proteína L22.
- k) Número de acceso a Genbank XP_057521 para la proteína L22.
- l) Número de acceso a Genbank XP_051279 para la proteína L22.
- m) Este residuo se halla en realidad a 5,87 Å.
- v) Los residuos en contacto de van der Waals con el antibiótico se definen como aquellos residuos dentro de r_{min} de cualquier átomo en el antibiótico, en donde $r_{min} = 21/6s$ y es el mínimo en el potencial de par de Lennard-Jones (ver: Computer Simulation of Liquids; Allen, M. P. y Tildesley, D. J.; Oxford University Press: New York, 1992, 11.). Los ss de Lennard-Jones se toman del campo de fuerzas de OPLS-AA (véase, por ejemplo Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S. y Tirado-Rives, J. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 11225-11236 y Jorgensen, W. L. BOSS, Versión 4.3; Yale University: New Haven, CT, 2002).
- 20 Tabla 14B. Residuos que definen el bolsillo de unión de tilosina (envuelta de 5,8 Å-12,6 Å)

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-resp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
C633	U576	G1284	G1365	NP*
U835	U744	U1491	U1570	NP
G836	G745	G1492	G1571	NP
U837	NP	A1493	A1572	NP
C838	NP	C1494	C1573	NP
U840	U747	U1496	U1575	NP
C842	A749	C1498	C1577	NP
C847	U754	C1503	C1582	NP
A882	A789	A1538	A1617	NP
U883	U790	U1539	U1618	NP
U1359	U1255	U2191	U2327	U351
G1688	G1613	G2634	G2770	G679
A1689	A1614	C2635	C2771	A680
C1690	C1615	A2636	A2772	U681

ES 2 448 815 T3

C1692	C1617	C2638	C2774	A683
G1694	G1619	G2640	G2776	A685
A1836	A1780	A3367	A3611	A830
C2056	A2015	A3587	A3831	A1008
U2057	U2016	C3588	C3832	U1009
G2073	G2032	C3603	C3847	G1025
A2095	A2054	G3625	G3869	A1047
A2096	C2055	A3626	A3870	C1048
G2097	G2056	A3627	A3871	G1049
A2101	A2060	A3631	A3875	A1053
C2104	C2063	C3634	C3878	C1056
C2105	C2064	C3635	C3879	C1057
A2474	A2439	A4106	A4345	A1256
C2476	U2441	C4108	C4347	C1258
U2478	C2443	C4110	C4349	U1260
G2481	G2446	G4113	G4352	G1263
G2482	G2447	G4114	G4353	G1264
A485	A2450	A4117	A4356	A1267
C2487	C2452	C4119	C4358	C1269
A2488	A2453	U4120	U4359	A1270
U2535	U2500	U4167	U4406	U1317
C2536	C2501	C4168	C4407	C1318
G2537	G2502	G4169	G4408	G1319
C2542	C2507	C4174	C4413	U1324
U2607	A2572	A4239	A4478	A1389
C2608	C2573	C4240	C4479	C1390
U2610	C2575	U4242	U4481	U1392
G2611	G2576	G4243	G4482	G1393
A2612	A2577	A4244	A4483	A1394
C2614	C2579	C4246	C4485	C1396
U2615	U2580	U4247	U4486	U1397
G2615	G2581	G4248	G4487	G1398
G2618	G2583	G4250	G4489	G1400
U2619	U2584	U2451	U4490	U1401
U2621	U2586	U4253	U4492	C1403

ES 2 448 815 T3

A2622	A2587	A4254	A4493	A1404
G2643	G2608	G4275	G4514	G1425
C2647	C2612	U4279	U4518	C1429
U2648	U2613	A4280	A4519	U1430
Proteína L3				
W242	Q150	W257	W257	G246
Proteína L4				
G62	G54	G68	G68	E73
S63	S55	T69	T69	Q74
G64	G56	G70	G70	E75
R65	K57	R71	R71	R76
G66	NP	A72	A72	G78
Q67	NP	V73	V73	L79
Proteína L22				
R128	R88	R131	R131	K184
A129	A89	A132	A132	A186
G131	G91	G134	G134	A188
R132	R92	R135	R135	H189
Proteína L37E				
T1	XX**	M1	M1	XX
Proteína L37E				
G2	XX	T2	T2	XX
A3	XX	K3	K3	XX
G4	XX	G4	G4	XX
T5	XX	T5	T5	XX
P6	XX	S6	S6	XX
S7	XX	S7	S7	XX
Q8	XX	F8	F8	XX

5 Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta 5,8 Å-12,6 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la subunidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8-12,6 angstroms con respecto a los átomos de tilosina, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr fueron determinados mediante la comparación de secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr^b con las secuencias correspondientes de ADN genómico que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^f, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanasⁱ). En los casos de proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre las secuencias estructurales de la proteína de *H. marismortui* y las secuencias correspondientes de secuencias de proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E. coli*^f, *Rattus norvegicus*^j, humano^k o mitocondrias humanas^l. Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) con parámetros por defecto. *NP significa que no se identificaron residuos homólogos. ** XX significa que no se identificó ninguna proteína homóloga en dichas especies.

10

a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27, 36-37.

b) Número de acceso a Genbank AF034619

c) Número de acceso a Genbank J01695

5 d) Número de acceso a Genbank 2624399

e) Número de acceso a Genbank M11167

f) Número de acceso a Genbank 13683

10 g) Número de acceso a Genbank AAA86859 para la proteína L3; número de acceso a Genbank P12735 para la proteína L4; número de acceso a Genbank R5HS24 para la proteína L22; número de acceso a Genbank P32410 para la proteína L37E.

i) Número de acceso a Genbank CAA26460 para la proteína L3; número de acceso a Genbank CAA26461 para la proteína L4; número de acceso a Genbank CAA26465 para la proteína L22; no hay Número de acceso a Genbank para la proteína L37E.

15 j) Número de acceso a Genbank P21531 para la proteína L3; número de acceso a Genbank JC4277 para la proteína L4; número de acceso a Genbank P24049 para la proteína L22; número de acceso a Genbank CAA47102 para la proteína L37E.

k) Número de acceso a Genbank NP_000958 para la proteína L3; número de acceso a Genbanks P36578, NP_000959, S39803, y T09551 para la proteína L4; número de acceso a Genbank XP_051279 para la proteína L22; número de acceso a Genbank NP_000988 para la proteína L37E.

20 l) Número de acceso a Genbank P09001 para la proteína L3; número de acceso a Genbank XP_049502 para la proteína L4; número de acceso a Genbank XP_051279 para la proteína L22; no hay Número de acceso a Genbank para la proteína L37E.

25 La Tabla 15A identifica los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen por lo menos una porción de un bolsillo de unión de esparsomicina (envuelta 5,8 angstroms). La Tabla 13A identifica los correspondientes residuos que definen por lo menos una porción del bolsillo de unión de esparsomicina en *E. coli*, *Rattus*, *humano*, y subunidad grande de mitocondrias humanas. Además, en la Tabla 15B se identifican los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen una porción más amplia de un bolsillo de unión de esparsomicina (envuelta de 5,8 – 12,6 angstroms). Los residuos no conservados han sido identificados como anteriormente descrito con respecto a las Tablas 5A y 5B.

30 Tabla 15A. Residuos que definen el bolsillo de unión de esparsomicina (envuelta de 5,8 Å)

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-rresp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
A2486 ^{h,v}	A2451	A4118	A4357	A1268
C2487 ^v	C2452	C4119	C4358	C1269
A2488 ^{m,v}	A2453	U4120	U4359	A1270
G2540 ^{m,v}	G2505	G4172	G4411	G1322
U2541 ^v	U2506	U4173	U4412	U1323
C2542	C2507	C4174	C4413	U1324
C2608 ^v	C2573	C4240	C4479	C1390
U2619 ^{h,v}	U2584	U4251	U4490	U1401
U2620 ^{h,v}	U2585	U4252	U4491	U1402
C2636	C2601	C4268	C4507	C1418

A2637 ^{h,v}	A2602	A4269	A4508	A1419
----------------------	-------	-------	-------	-------

- Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta de 5,8 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la unidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8 angstroms de los átomos de esparsomicina, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr fueron determinados mediante la comparación de secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr^b con las secuencias correspondientes de ADN genómico que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e, mitocondrias humanas^f). Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.), para lo cual se utilizaron parámetros por defecto.
- 5 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27,36-37.
- 10 b) Número de acceso a Genbank AF034619
c) Número de acceso a Genbank J01695
d) Número de acceso a Genbank 2624399
e) Número de acceso a Genbank M11167
- 15 f) Número de acceso a Genbank 13683
- h) Indica el residuo que se halla dentro de la distancia de unión del hidrógeno (3,5 Å) del ligando, por ejemplo, ver Jorgensen, WL, Nguyen, TB. (1993) J. Comput. Chem. 14:195-205.
- m) El residuo A2488 es de hecho 6,0 Å; el residuo G2540 es realmente 5,85 Å.
- 20 v) Los residuos en contacto de van der Waals con el antibiótico se definen como aquellos residuos dentro de r_{min} de cualquier átomo en el antibiótico, en donde $r_{min} = 21/6s$ y es el mínimo en el potencial de par de Lennard-Jones (ver: Computer Simulation of Liquids; Allen, M. P. y Tildesley, D. J.; Oxford University Press: New York, 1992, 11.). Los ss de Lennard-Jones se toman del campo de fuerzas de OPLS-AA (véase, por ejemplo Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S. y Tirado-Rives, J. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 11225-11236 y Jorgensen, W. L. BOSS, Versión 4.3; Yale University: New Haven, CT, 2002).
- 25 Tabla 15B. Residuos que definen el bolsillo de unión de esparsomicina (envuelta de 5,8 Å-12,6 Å)

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo correspondiente en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
G2073	G2032	C3603	C3847	G1025
G2102	G2061	G3632	G3876	G1054
A2103	A2062	A3633	A3877	A1055
C2104	C2063	C3634	C3878	C1056
C2105	C2064	C3635	C3879	C1057
C2106	C2065	C3636	C3880	C1058
G2284	G2251	G3917	G4156	G1145
G2285	G2252	G3918	G4157	G1146
G2286	G2253	G3919	G4158	G1147
U2473	U2438	U4105	U4344	U1255
A2474	A2439	A4106	A4345	A1256
G2482	G2447	G4114	G4353	G1264

ES 2 448 815 T3

A2485	A2450	A4117	A4356	A1267
G2498	C2463	C4130	C4369	U1280
U2527	U2492	U4159	U4398	U1309
U2528	U2493	U4160	U4399	U1310
G2529	G2494	G4161	G4400	A1311
C2530	G2495	A4162	A4401	C1312
A2532	A2497	C4164	C4403	A1314
C2534	C2499	U4166	U4405	C1316
U2535	U2500	U4167	U4406	U1317
C2536	C2501	C4168	C4407	C1318
A2538	A2503	A4170	A4409	A1320
U2539	U2504	U4171	U4410	U1321
G2543	G2508	G4175	G4414	G1325
G2588	G2553	G4220	G4459	G1370
U2589	U2554	U4221	U4460	U1371
U2590	U2555	U4222	U4461	U1372
U2607	A2572	A4239	A4478	A1389
G2609	G2574	G4241	G4480	G1391
U2610	C2575	U4242	U4481	U1392
G2611	G2576	G4243	G4482	G1393
G2617	G2582	G4249	G4488	A1399
G2618	G2583	G4250	G4489	G1400
U2621	U2586	U4253	U4492	C1403
A2622	A2587	A4254	A4493	A1404
G2627	G2592	G4259	G4498	G1409
A2635	A2600	A4267	A4506	C1417
G2638	G2603	G4270	G4509	G1420
G2639	U2604	G4271	G4510	G1421
U2640	U2605	U4272	U4511	U1422
23S ARNr				
G2643	G2608	G4275	G4514	G1425
Proteína L3				
W242	Q150	W257	W257	G246

Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta de 5,8 Å-12,6 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la unidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8-12,6 angstroms con respecto a los átomos de esparsomicina, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr^b fueron

- determinados mediante la comparación de secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr* con las secuencias correspondientes de ADN genómico que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f). En los casos de proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre la secuencia estructural de la proteína de *marismortui*^g y las secuencias correspondientes de las secuencias de proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E. coli*^h, *Rattus norvegicus*ⁱ, humano^k o mitocondrias humanas^l. Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas mediante el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) con parámetros por defecto.
- 5 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27, 36-37.
- 10 b) Número de acceso a Genbank AF034619
- c) Número de acceso a Genbank J01695
- d) Número de acceso a Genbank 2624399
- e) Número de acceso a Genbank M11167
- f) Número de acceso a Genbank 13683
- 15 g) Número de acceso a Genbank AAA86859 para la proteína L3.
- i) Número de acceso a Genbank CAA26460 para la proteína L3.
- j) Número de acceso a Genbank P21531 para la proteína L3.
- k) Número de acceso a Genbank NP_000958 para la proteína L3.
- l) Número de acceso a Genbank P09001 para la proteína L3.
- 20 La Tabla 16A identifica los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen por lo menos una porción de un bolsillo de unión de virginiamicina (envuelta 5,8 angstroms). Además, la Tabla 16A identifica los correspondientes residuos que definen por lo menos una porción del bolsillo de unión de virginiamicina M en *E. coli*, *Rattus*, *humano*, y subunidad grande de mitocondrias humanas. Además, en la Tabla 16B se identifican los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen una porción más amplia de un bolsillo de unión de virginiamicina (envuelta de 5,8 – 12,6 angstroms). Los residuos no conservados han sido
- 25 identificados como anteriormente descrito con respecto a las Tablas 5A y 5B.

Tabla 16A. Residuos que definen el bolsillo de unión de virginiamicina M (envuelta de 5,8 Å)

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-rresp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
A2100 ^v	A2059	A3630	A3874	A1052
G2102 ^{h,v}	G2061	G3632	G3876	G1054
A2103 ^{h,v}	A2062	A3633	A3877	A1055
C2104 ^{h,v}	C2063	C3634	C3878	C1056
C2105	C2064	C3635	C3879	C1057
A2474	A2439	A4106	A4345	A1256
G2482 ^v	G2447	G4114	G4353	G1264
A2486 ^v	A2451	A4118	A4357	A1268
C2487 ^v	C2452	C4119	C4358	C1269
U2535 ^v	U2500	U4167	U4406	U1317
A2538 ^{h,v}	A2503	A4170	A4409	A1320
U2539 ^v	U2504	U4171	U4410	U1321

ES 2 448 815 T3

G2540 ^v	G2505	G4172	G4411	G1322
U2541 ^v	U2506	U4173	U4412	U1323
U2620 ^v	U4252	U2585	U4491	U1402

Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta de 5,8 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la unidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8 angstroms de los átomos de virginiamicina M, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr fueron determinados mediante la comparación de secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr^b con las secuencias correspondientes de ADN genómico que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f). Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) para lo cual se utilizaron parámetros por defecto.

5 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27, 36-37.

b) Número de acceso a Genbank AF034619

c) Número de acceso a Genbank J01695 d) Número de acceso a Genbank 2624399

e) Número de acceso a Genbank M11167

f) Número de acceso a Genbank 13683

15 h) Indica el residuo que se halla dentro de la distancia de unión del hidrógeno (3,5 Å) del ligando, por ejemplo, ver Jorgensen, WL, Nguyen, TB. (1993) J. Comput. Chem. 14:195-205.

v) Los residuos en contacto de van der Waals con el antibiótico se definen como aquellos residuos dentro de r_{min} de cualquier átomo en el antibiótico, en donde $r_{min} = 21/6s$ y es el mínimo en el potencial de par de Lennard-Jones (ver: Computer Simulation of Liquids; Allen, M. P. y Tildesley, D. J.; Oxford University Press: New York, 1992, 11.). Los ss de Lennard-Jones se toman del campo de fuerzas de OPLS-AA (véase, por ejemplo Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S. y Tirado-Rives, J. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 11225-11236 y Jorgensen, W. L. BOSS, Versión 4.3; Yale University: New Haven, CT, 2002).

Tabla 16B. Residuos que definen el bolsillo de unión de virginiamicina M (envuelta de 5,8 Å-12,6 Å)

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo correspondiente en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
A631	A574	G1282	G1363	NP*
A632	A575	C1283	C1364	NP
C633	U576	G1284	G1365	NP
U1838	U1782	U3369	U3613	C832
G2073	G2032	C3603	C3847	G1025
A2095	A2054	G3625	G3869	A1047
A2096	C2055	A3626	A3870	C1048
G2097	G2056	A3627	A3871	G1049
C2098	G2057	A3628	A3872	A1050
G2099	A2058	G3629	G3873	G1051
A2101	A2060	A3631	A3875	A1053
C2106	C2065	C3636	C3880	C1058

ES 2 448 815 T3

U2107	C2066	U3637	U3881	U1059
G2284	G2251	G3917	G4156	G1145
U2473	U2438	U4105	U4344	U1255
C2475	C2440	C4107	C4346	C1257
C2476	U2441	C4108	C4347	C1258
C2477	C2442	A4109	A4348	C1259
U2478	C2443	C4110	C4349	U1260
A2479	G2444	A4111	A4350	A1261
G2480	G2445	G4112	G4351	G1262
G2481	G2446	G4113	G4352	G1263
U2484	U2449	U4116	U4355	U1266
A2485	A2450	A4117	A4356	A1267
A2488	A2453	U4120	U4359	A1270
G2489	G2454	G4121	G4360	G1271
A2532	A2497	C4164	C4403	A1314
C2534	C2499	U4166	U4405	C1316
C2536	C2501	C4168	C4407	C1318
G2537	G2502	G4169	G4408	G1319
C2542	C2507	C4174	C4413	U1324
U2607	A2572	A4239	A4478	A1389
C2608	C2573	C4240	C4479	C1390
U2610	C2575	U4242	U4481	U1392
G2611	G2576	G4243	G4482	G1393
A2612	A2577	A4244	A4483	A1394
G2618	G2583	G4250	G4489	G1400
U2619	U2584	U4251	U4490	U1401
U2621	U2586	U4253	U4492	C1403
A2622	A2587	A4254	A4493	A1404
C2636	C2601	C4268	C4507	C1418
A2637	A2602	A4269	A4508	A1419
G2643	G2608	G4275	G4514	G1425
C2644	U2609	U4276	U4515	U1426
U2645	C2610	U4277	U4516	U1427
G2646	C2611	U4278	U4517	U1428
L3				

W242	Q150	W257	W257	G246
------	------	------	------	------

Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta de 5,8 Å-12,6 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la unidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8-12,6 angstroms de los átomos de virginiamicina M, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr fueron determinados mediante la comparación de secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr^b con las secuencias correspondientes de ADN genómico que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f). En los casos de proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre la secuencia estructural de la proteína de *H. marismortui* y las secuencias correspondientes de las proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E. coli*, *Rattus norvegicus*^g, humano^k o mitocondrias humanas^l. Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) con parámetros por defecto. *NP significa que no se identificaron residuos homólogos.

a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27, 36-37.

b) Número de acceso a Genbank AF034619

15 c) Número de acceso a Genbank J01695

d) Número de acceso a Genbank 2624399

e) Número de acceso a Genbank M11167

f) Número de acceso a Genbank 13683

g) Número de acceso a Genbank AAA86859 para la proteína L3.

20 i) Número de acceso a Genbank CAA26460 para la proteína L3.

j) Número de acceso a Genbank P21531 para la proteína L3.

k) Número de acceso a Genbank NP_000958 para la proteína L3.

l) Número de acceso a Genbank P09001 para la proteína L3.

La Tabla 17A identifica los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen por lo menos una porción de un bolsillo de unión de espiramicina (envuelta 5,8 angstroms). Además, la Tabla 17A identifica los correspondientes residuos que definen por lo menos una porción del bolsillo de unión de espiramicina en *E. coli*, *Rattus*, humano, y subunidad grande de mitocondrias humanas. Por otra parte, en la Tabla 17B se identifican los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen una porción más amplia de un bolsillo de unión de espiramicina (envuelta de 5,8 – 12,6 angstroms). Los residuos no conservados han sido identificados como anteriormente descrito con respecto a las Tablas 5A y 5B.

Tabla 17A. Residuos que definen el bolsillo de unión de espiramicina (envuelta de 5,8 Å)

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-resp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
C839 ^v	U746	G1495	G1574	NP*
C2098	G2057	A3628	A3872	A1050
G2099 ^{h,v}	A2058	G3629	G3873	G1051
A2100 ^v	A2059	A3630	A3874	A1052
A2103 ^{h,v}	A2062	A3633	A3877	A1055
A2538 ^v	A2503	A4170	A4409	A1320
U2539 ^v	U2504	U4171	U4410	U1321
G2540 ^{h,v}	G2505	G4172	G4411	G1322

U2620 ^{m,v}	U2585	U4252	U4491	U1402
C2644	U2609	U4276	U4515	U1426
G2646 ^v	C2611	U4278	U4517	U1428
L4				
S63 ^v	S55	T69	T69	Q74
G64 ^v	G56	G70	G70	E75
R65 ^v	K57	R71	R71	R76
L22				
M130 ^{m,v}	K90	H133	H133	V187

- Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta de 5,8 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la unidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8 angstroms de los átomos de spiramicina, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados fueron determinados mediante comparación entre las estructuras secundarias propuestas *H. marismortui*^b, *E. coli*^b, y *Rattus norvegicus*^c, humano^d y mitocondrias humanas^e. Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.), para lo cual se utilizaron parámetros por defecto. *NP significa que no se identificaron residuos homólogos.
- 5 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27, 36-37.
- 10 b) Número de acceso a Genbank AF034619
c) Número de acceso a Genbank J01695
d) Número de acceso a Genbank 2624399
e) Número de acceso a Genbank M11167
- 15 f) Número de acceso a Genbank 13683
g) Número de acceso a Genbank P12735 para la proteína L4; número de acceso a Genbank R5HS24 para la proteína L22.
h) Indica un residuo que se halla dentro de la distancia de unión del hidrógeno (3.5 angstroms) del ligando; por ejemplo ver Jorgensen, WL, Nguyen, TB. J. Comput. Chem. (1993) 14:195-205.
- 20 i) Número de acceso a Genbank CAA26461 para la proteína L4; número de acceso a Genbank CAA26465 para la proteína L22.
j) Número de acceso a Genbank JC4277 para la proteína L4; número de acceso a Genbank P24049 para la proteína L22
- 25 k) Números de acceso a Genbank P36578, NP_000959, S39803, y T09551 para la proteína L4; número de acceso a Genbank XP_051279 para la proteína L22.
l) Número de acceso a Genbank XP_049502 para la proteína L4; número de acceso a Genbank XP_051279 para la proteína L22.
- m) El residuo U2620 se halla en realidad a 5,83 Å; M130 se halla en realidad a 5,87 Å.
- 30 v) los residuos en contacto de van der Waals con el antibiótico se definen como aquellos residuos dentro de rmin de cualquier átomo en el antibiótico, en donde $r_{min} = 21/6s$ y es el mínimo en el potencial de pares de Lennard-Jones (ver: Computer Simulation of Liquids; Allen, M. P. y Tildesley, D. J.; Oxford University Press: New York, 1992, 11.). Los ss de Lennard-Jones se toman del campo de fuerzas de OPLS-AA (véase, por ejemplo Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S. y Tirado-Rives, J. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 11225-11236 y Jorgensen, W. L. BOSS, Versión 4.3; Yale University: New Haven, CT, 2002).
- 35 Tabla 17B. Residuos que definen el bolsillo de unión de espiramicina (envuelta de 5.8 Å-12.6 Å)

ES 2 448 815 T3

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-resp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
A841	G748	G1497	G1576	NP*
A843	A750	A1499	A1578	NP
A844	A751	A1500	A1579	NP
U845	A752	A1501	A1580	NP
A846	A753	U1502	U1581	NP
A841	G748	G1497	G1576	NP
A766	A675	A1424	A1502	NP*
A767	A676	A1425	A1503	NP
U835	U744	U1491	U1570	NP
G836	G745	G1492	G1571	NP
U837	NP	A1493	A1572	NP
C838	NP	C1494	C1573	NP
U840	U747	U1496	U1575	NP
A882	A789	A1538	A1617	NP
U883	U790	U1539	U1618	NP
C884	C791	C1540	C1619	NP
U1359	U1255	U2192	U2327	U351
G1837	U1781	A3368	A3612	C831
U1838	U1782	U3369	U3612	C832
C2056	A2015	A3587	A3831	A1008
U2057	U2016	C3588	C3832	U1009
G2073	G2032	C3603	C3847	G1025
A2095	A2054	G3625	G3869	A1047
G2097	G2056	A3627	A3871	G1049
A2101	A2060	A3631	A3875	A1053
C2104	C2063	C3634	C3878	C1056
C2105	C2064	C3625	C3879	C1057
A2474	A2439	A4106	A4345	A1256
C2476	U2441	C4108	C4347	C1258
C2477	C2442	A4109	A4348	C1259
2478	C2443	C4110	C4349	U1260
A2479	G2444	A4111	A4350	A1261

ES 2 448 815 T3

G2481	G2446	G4113	G4352	G1263
G2482	G2447	G4114	G4353	G1264
A2485	A2450	A4117	A4356	A1267
A2486	A2451	A4118	A4357	A1268
C2487	C2452	C4119	C4358	C1269
A2488	A2453	U4120	U4359	A1270
U2535	U2500	U4167	U4406	U1317
C2536	C2501	C4168	C4407	C1318
G2537	G2502	G4169	G4408	G1319
C2542	C2507	C4174	C4413	U1324
U2607	A2572	A4239	A4478	A1389
C2608	C2573	C4240	C4479	C1390
U2610	C2575	U4242	U4481	U1392
G2611	G2576	G4243	G4482	G1393
A2612	A2577	A4244	A4483	A1394
C2614	C2579	C4246	C4485	C1396
U2615	U2580	U4247	U4486	U1397
G2616	G2581	G4248	G4487	G1398
G2618	G2583	G4250	G4489	G1400
U2619	U2584	U4251	U4490	U1401
U2621	U2586	U4253	U4492	C1403
G2643	G2608	G4275	G4514	G1425
U2645	C2610	U4277	U4516	U1427
C2647	C2612	U4279	U4518	C1429
U2648	U2613	A4280	A4519	U1430
Proteína L3				
W242	Q150	W257	W257	G246
Proteína L4				
S60	V52	S66	S66	G71
F61	T53	W67	W67	F72
G62	G54	G68	G68	E73
G66	NP	A72	A72	G78
Q67	NP	V73	V73	L79
A68	NP	A74	A74	A80
H69	K58	R75	R75	D81

Proteína L22				
A129	A89	A132	A132	A186
G131	G91	G134	G134	A188
Proteína L22				
R132	R92	R135	R135	H189

Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta de 5,8 Å-12,6 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la unidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8-12,6 angstroms de los átomos de espiramicina, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr fueron determinados mediante la comparación de secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr^b con las secuencias correspondientes de ADN genómico que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f). En los casos de proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre la secuencia estructural de la proteína de *H. marismortui*^g y las secuencias correspondientes de las secuencias de proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E. coli*ⁱ, *Rattus norvegicus*^j humano^k o mitocondrias humanas^l. Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) para lo cual se utilizaron parámetros por defecto. *NP significa que no se identificaron residuos homólogos.

a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27, 36-37.

b) Número de acceso a Genbank AF034619

15 c) Número de acceso a Genbank J01695

d) Número de acceso a Genbank 2624399

e) Número de acceso a Genbank M11167

f) Número de acceso a Genbank 13683

20 g) Número de acceso a Genbank AAA86859 para la proteína L3; número de acceso a Genbank P12735 para la proteína L4; número de acceso a Genbank R5HS24 para la proteína L22.

h) Indica un residuo que se halla dentro de distancia de unión del hidrógeno (3,5 angstroms) del ligando; por ejemplo, ver Jorgensen, WL, Nguyen, TB. (1993) J. Comput. Chem. 14:195-205.

i) Número de acceso a Genbank CAA26460 para la proteína L3; número de acceso a Genbank CAA26461 para la proteína L4; número de acceso a Genbank CAA26465 para la proteína L22.

25 j) Número de acceso a Genbank P21531 para la proteína L3; número de acceso a Genbank JC4277 para la proteína L4; número de acceso a Genbank P24049 para la proteína L22.

k) Número de acceso a Genbank NP_000958 para la proteína L3; número de acceso a Genbanks P36578, NP_000959, S39803, y T09551 para la proteína L4; número de acceso a Genbank XP_051279 para la proteína L22.

30 l) Número de acceso a Genbank P09001 para la proteína L3; número de acceso a Genbank XP_049502 para la proteína L4; número de acceso a Genbank XP_051279 para la proteína L22.

v) Los residuos en contacto de van der Waals con el antibiótico se definen como aquellos residuos dentro de r_{min} de cualquier átomo en el antibiótico, en donde $r_{min} = 21/6s$ y es el mínimo en el potencial de pares de Lennard-Jones (ver: Computer Simulation of Liquids; Allen, M. P. y Tildesley, D. J.; Oxford University Press: New York, 1992, 11.). Los ss de Lennard-Jones se toman del campo de fuerzas de OPLS-AA (véase, por ejemplo Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S. y Tirado-Rives, J. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 11225-11236 y Jorgensen, W. L. BOSS, Versión 4.3; Yale University: New Haven, CT, 2002).

40 La Tabla 18A identifica los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen por lo menos una porción de un bolsillo de unión de eritromicina (envuelta 5,8 angstroms). Además, la Tabla 18A identifica los correspondientes residuos que definen por lo menos una porción del bolsillo de unión de eritromicina en *E. coli*, *Rattus*, humano, y subunidad grande de mitocondrias humanas. Por otra parte, en la Tabla 18B se identifican los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen una porción más amplia de un bolsillo de unión de eritromicina (envuelta de 5,8 – 12,6 angstroms). Los residuos no conservados han sido identificados como anteriormente descrito con respecto a las Tablas 5A y 5B.

Tabla 18A. Residuos que definen el bolsillo de unión de eritromicina (envuelta de 5,8 Å)

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-resp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
C839 ^v	U746	G1495	G1574	NP*
A841 ^v	G748	G1497	G1576	NP
C2098 ^{m,v}	G2057	A3628	A3872	A1050
G2099 ^{h,v}	A2058	G3629	G3873	G1051
A2100 ^v	A2059	A3630	A3874	A1052
A2103 ^v	A2062	A3633	A3877	A1055
A2538 ^v	A2503	A4170	A4409	A1320
G2540 ^v	G2505	G4172	G4411	G1322
C2644 ^v	U2609	U4276	U4515	U1426
U2645 ^v	C2610	U4277	U4516	U1427
G2646 ^v	C2611	U4278	U4517	U1428
L4				
G64 ^v	G56	G70	G70	E75
L22				
M130 ^{m,v}	K90	H133	H133	V187

5 Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta de 5,8 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la unidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8 angstroms de los átomos de eritromicina, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr fueron determinados mediante la comparación de secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr^b con las secuencias correspondientes de ADN genómico que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f). En los casos de proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre la secuencia estructural de la proteína de *H. marismortui* y las secuencias correspondientes de proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E. coli*, *Rattus norvegicus*^j, humano^k o mitocondrias humanas^l. Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) para lo cual se utilizaron parámetros por defecto. *NP significa que no se identificaron residuos homólogos.

10 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1): 13-27, 36-37.

15 b) Número de acceso a Genbank AF034619

c) Número de acceso a Genbank J01695

d) Número de acceso a Genbank 2624399

e) Número de acceso a Genbank M11167

f) Número de acceso a Genbank 13683

20 g) Número de acceso a Genbank P12735 para la proteína L4; número de acceso a Genbank R5HS24 para la proteína L22.

h) Indica un residuo que se halla dentro de la distancia de unión del hidrógeno (3,5 Å) del ligando; por ejemplo, ver: Jorgensen, WL, Nguyen, TB. (1993) J. Comput. Chem. 14:195-205.

25 i) Número de acceso a Genbank CAA26461 para la proteína L4; número de acceso a Genbank CAA26465 para la proteína L22.

j) Número de acceso a Genbank JC4277 para la proteína L4; número de acceso a Genbank P24049 para la proteína L22 k) Número de acceso a Genbank P36578, NP_000959, S39803, y T09551 para la proteína L4; número de acceso a Genbank XP_051279 para la proteína L22.

5 l) Número de acceso a Genbank XP_049502 para la proteína L4; número de acceso a Genbank XP_051279 para la proteína L22.

m) El residuo C2098 se halla en realidad a 5,99 Å; M130 se halla a 5,90 Å.

10 v) Los residuos en contacto de van der Waals con el antibiótico se definen como aquellos residuos dentro de r_{min} de cualquier átomo en el antibiótico, en donde $r_{min} = 21/6s$ y es el mínimo en el potencial de pares de Lennard-Jones (ver: Computer Simulation of Liquids; Allen, M. P. y Tildesley, D. J.; Oxford University Press: New York, 1992, 11.). Los ss de Lennard-Jones se toman del campo de fuerzas de OPLS-AA (véase, por ejemplo Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S. y Tirado-Rives, J. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 11225-11236 y Jorgensen, W. L. BOSS, Versión 4.3; Yale University: New Haven, CT, 2002).

Tabla 18B. Residuos que también definen el bolsillo de unión de eritromicina

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-rresp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
C633	U576	G1284	G1365	NP*
U835	U744	U1491	U1570	NP
G836	G745	G1492	G1571	NP
U837	NP	A1493	A1572	NP
C838	NP	C1494	C1573	NP
U840	U747	U1496	U1575	NP
A843	A750	A1499	A1578	NP
A844	A751	A1500	A1579	NP
U845	A752	A1501	A1580	NP
A846	A753	U1502	U1581	NP
C847	U754P	C1503	C1582	NP
U1359	U1255	U2191	U2327	U351
G1837	U1781	A3368	A3612	C831
U1838	U1782	U3369	U3613	C832
C2056	A2015	A3587	A3831	A1008
U2057	U2016	C3588	C3832	U1009
A2096	C2055	A3626	A3870	C1048
G2097	G2056	A3627	A3871	G1049
A2101	A2060	A3631	A3875	A1053
G2102	G2061	G3632	G3876	G1054
C2104	C2063	C3634	C3878	C1056
C2105	C2064	C3635	C3879	C1057
A2474	A2439	A4106	A4345	A1256

ES 2 448 815 T3

C2476	U2441	C4108	C4347	C1258
C2477	C2442	A4109	A4348	C1259
U2478	C2443	C4110	C4349	U1260
G2482	G2447	G4114	G4353	G1264
A2486	A2451	A4118	A4357	A1268
C2487	C2452	C4119	C4358	C1269
2535	U2500	U4167	U4406	U1317
C2536	C2501	C4168	C4407	C1318
G2537	G2502	G4169	G4408	G1319
U2539	U2504	U4171	U4410	U1321
U2541	U2506	U4173	U4412	U1323
C2542	C2507	C4174	C4413	U1324
G2543	G2508	04175	G4414	G1325
G2611	G2576	G4243	G4482	G1393
A2612	A2577	A4244	A4483	A1394
G2613	G2578	G4245	G4484	U1395
C2614	C2579	C4246	C4485	C1396
U2615	U2580	U4247	U4486	U1397
G2616	G2581	G4248	G4487	G1398
G2617	G2582	G4249	G4488	A1399
G2618	G2583	G4250	G4489	G1400
U2619	U2584	U4251	U4490	U1401
U2620	U2585	U4252	U4491	U1402
U2621	U2586	U4253	U4492	C1403
A2622	A2587	A4254	A4493	A1404
G2643	G2608	G4275	G4514	G1425
C2647	C2612	U4279	U4518	C1429
U2648	U2613	A4280	A4519	U1430
Proteina L3				
W242	Q150	W257	W257	G246
Proteina L4				
G62	G54	G68	G68	E73
S63	S55	T69	T69	Q74
R65	K57	R71	R71	R76
Q67	NP*	A72	A72	G78

Proteína L22				
A129	A89	A132	A132	A186
G131	G91	G134	G134	A188
Proteína L22				
R132	R92	R135	R135	H189

Los residuos que definen el bolsillo de unión (5,8 Å-12,6 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la unidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8-12,6 angstroms de los átomos de eritromicina, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr fueron determinados mediante la comparación de secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr^b con las secuencias correspondientes de ADN genómico que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, *humano*^e o mitocondrias humanas^f). En los casos de proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre la secuencia estructural de la proteína de *H. marismortui* y las secuencias correspondientes de proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E. coli*, *Rattus norvegicus*^j, *humano*^k o mitocondrias humanas^l. Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) para lo cual se utilizaron parámetros por defecto. *NP significa que no se identificaron residuos homólogos.

a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27, 36-37.

b) Número de acceso a Genbank AF034619

15 c) Número de acceso a Genbank J01695

d) Número de acceso a Genbank 2624399

e) Número de acceso a Genbank M11167

f) Número de acceso a Genbank 13683

20 g) Número de acceso a Genbank AAA86859 para la proteína L3; número de acceso a Genbank P12735 para la proteína L4; número de acceso a Genbank R5HS24 para la proteína L22.

h) Indica un residuo que se halla dentro de distancia de ligazón a hidrógeno (3.5 Å) del ligando; por ejemplo, véase Jorgensen, WL, Nguyen, TB. (1993) J. Comput. Chem. 14:195-205.

i) Número de acceso a Genbank CAA26460 para la proteína L3; número de acceso a Genbank CAA26461 para la proteína L4; número de acceso a Genbank CAA26465 para la proteína L22.

25 j) Número de acceso a Genbank P21531 para la proteína L3; número de acceso a Genbank JC4277 para la proteína L4; número de acceso a Genbank P24049 para la proteína L22.

k) Número de acceso a Genbank NP_000958 para la proteína L3; número de acceso a Genbanks P36578, NP_000959, S39803, y T09551 para la proteína L4; número de acceso a Genbank XP_051279 para la proteína L22.

30 l) Número de acceso a Genbank P09001 para la proteína L3; número de acceso a Genbank XP_049502 para la proteína L4; número de acceso a Genbank XP_051279 para la proteína L22.

v) Los residuos en contacto de van der Waals con el antibiótico se definen como aquellos residuos dentro de r_{min} de cualquier átomo en el antibiótico, en donde $r_{min} = 21/6s$ y es el mínimo en el potencial de pares de Lennard-Jones (ver: Computer Simulation of Liquids; Allen, M. P. y Tildesley, D. J.; Oxford University Press: New York, 1992, 11.). Los ss de Lennard-Jones se toman del campo de fuerzas de OPLS-AA (véase, por ejemplo Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S. y Tirado-Rives, J. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 11225-11236 y Jorgensen, W. L. BOSS, Versión 4.3; Yale University: New Haven, CT, 2002).

40 La Tabla 19A identifica los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen por lo menos una porción de un bolsillo de unión de azitromicina (envuelta 5,8 angstroms). Además, la Tabla 19A identifica los correspondientes residuos que definen por lo menos una porción del bolsillo de unión de azitromicina en *E. coli*, *Rattus*, *humano*, y subunidad grande de mitocondrias humanas. Por otra parte, en la Tabla 19B se identifican los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen una porción más amplia de un bolsillo de unión de azitromicina (envuelta de 5,8 – 12,6 angstroms). Los residuos no conservados han sido identificados como anteriormente descrito con respecto a las Tablas 5A y 5B.

Tabla 19A. Residuos que definen el bolsillo de unión de azitromicina (envuelta de 5,8 Å)

Residuo <i>H. marismortui</i>	Residuo co-rresp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
C839 ^v	U746	G1495	G1574	NP*
G2099 ^{n,v}	A2058	G3629	G3873	G1051
A2100 ^v	A2059	A3630	A3874	A1052
A2103 ^v	A2062	A3633	A3877	A1055
A2538 ^v	A2503	A4170	A4409	A1320
G2540 ^v	G2505	G4172	G4411	G1322
U2541 ^{m,v}	U2506	U4173	U4412	U1323
C2644 ^v	U2609	U4276	U4515	U1426
U2645 ^v	C2610	U4277	U4516	U1427
C2646 ^v	C2611	U4278	U4517	U1428
Proteína L22				
M129 ^{m,x}	K90	H133	H133	V187

Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta de 5,8 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la unidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8 angstroms con respecto a los átomos de azitromicina para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr fueron determinados mediante la comparación de secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr^b con las secuencias correspondientes de ADN genómico que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f). En los casos de proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre la secuencia estructural de la proteína de *H. marismortui* y las correspondientes secuencias de las proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E. coli*, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f. Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) para lo cual se utilizaron parámetros por defecto. *NP significa que no se identificaron residuos homólogos.

- 5 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27, 36-37.
- 15 b) Número de acceso a Genbank AF034619
- c) Número de acceso a Genbank J01695
- d) Número de acceso a Genbank 2624399
- e) Número de acceso a Genbank M11167
- f) Número de acceso a Genbank 13683
- 20 g) Número de acceso a Genbank R5HS24 para la proteína L22.
- h) Indica un residuo que se halla dentro de la distancia de ligazón a hidrógeno (3.5 Å) del ligando; por ejemplo, véase Jorgensen, WL, Nguyen, TB. (1993) J. Comput. Chem. 14:195-205.
- i) Número de acceso a Genbank CAA26465 para la proteína L22.
- 25 j) Número de acceso a Genbank P24049 para la proteína L22 k) Número de acceso a Genbank XP_051279 para la proteína L22.
- l) Número de acceso a Genbank XP_051279 para la proteína L22.
- m) El residuo U2541 se halla en realidad a 5,93 Å; M130 se halla a 5,95 Å.

- v) Los residuos en contacto de van der Waals con el antibiótico se definen como aquellos residuos dentro de r_{min} de cualquier átomo en el antibiótico, en donde $r_{min} = 21/6s$ y es el mínimo en el potencial de pares de Lennard-Jones (ver: Computer Simulation of Liquids; Allen, M. P. y Tildesley, D. J.; Oxford University Press: New York, 1992, 11.). Los ss de Lennard-Jones se toman del campo de fuerzas de OPLS-AA (véase, por ejemplo Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S. y Tirado-Rives, J. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 11225-11236 y Jorgensen, W. L. BOSS, Versión 4.3; Yale University: New Haven, CT, 2002).

Tabla 19B. Residuos que también definen el bolsillo de unión de azitromicina

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-rresp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
C633	U576	G1284	G1365	NP*
U835	U744	U1491	U1570	NP
G836	G745	G1492	G1571	NP
U837	NP	A1493	A1572	NP
C838	NP	C1494	C1573	NP
U840	U747	U1496	U1575	NP
A841	G748	G1497	G1576	NP
A843	A750	A1499	A1578	NP
A844	A751	A1500	A1579	NP
U845	A752	A1501	A1580	NP
A846	A753	U1502	U1581	NP
C847	U754	C1503	C1582	NP
U1359	U1255	U2191	U2327	U351
G1837	U1781	A3368	A3612	C831
U1838	U1782	U3369	U3613	C832
C2056	A2015	A3587	A3831	A1008
U2057	U2016	C3588	C3832	U1009
A2096	C2055	A3626	A3870	C1048
G2097	G2056	A3627	A3871	G1049
C2098	G2057	A3628	A3872	A1050
A2101	A2060	A3631	A3875	A1053
G2102	G2061	G3632	G3876	G1054
C2104	C2063	C3634	C3878	C1056
C2105	C2064	C3635	C3879	C1057
A2474	A2439	A4106	A4345	A1256
C2476	U2441	C4108	C4347	C1258
C2477	C2442	A4109	A4348	C1259
U2478	C2443	C4110	C4349	U1260

ES 2 448 815 T3

G2481	G2446	G4113	G4352	G1263
G2482	G2447	G4114	G4353	G1264
A2486	A2451	A4118	A4357	A1268
C2487	C2452	C4119	C4358	C1269
U2535	U2500	U4167	U4406	U1317
C2536	C2501	C4168	C4407	C1318
G2537	G2502	G4169	G4408	G1319
U2539	U2504	U4171	U4410	U1321
C2542	C2507	C4174	C4413	U1324
G2543	G2508	G4175	G4414	G1325
U2607	A2572	A4239	A4478	A1389
G2611	G2576	G4243	G4482	G1393
A2612	A2577	A4244	A4483	A1394
G2613	G2578	G4245	G4484	U1395
C2614	C2579	C4246	C4485	C1396
G2616	G2581	G4248	G4487	G1398
G2617	G2582	G4249	G4488	A1399
G2618	G2583	G4250	G4489	G1400
U2619	U2584	U4251	U4490	U1401
U2620	U2585	U4252	U4491	U1402
U2621	U2586	U4253	U4492	C1403
U2615	U2580	U4247	U4486	U1397
A2622	A2587	A4254	A4493	A1404
G2643	G2608	G4275	G4514	G1425
C2647	C2612	U4279	U4518	C1429
U2648	U2613	A4280	A4519	U1430
Proteína L3				
W232	S139	NP	NP	T236
W242	Q150	W257	W257	G246
Proteína L4				
G62	G54	G68	G68	E73
S63	S55	T69	T69	Q74
G64	G56	G70	G70	E75
R65	K57	R71	R71	R76
G66	NP	A72	A72	G78

Q67	NP*	V73	V73	L79
Proteína L22				
A129	A89	A132	A132	A186
G131	G91	G134	G134	A188
Proteína L22				
R132	R92	R135	R135	H189

Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta de 5,8 Å-12,6 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la unidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8-12,6 angstroms de los átomos de azitromicina, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr fueron determinados mediante la comparación de secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr^p con las secuencias correspondientes de ADN genómico que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^q, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f). En los casos de proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre la secuencia estructural de la proteína de *H. marismortui* y las correspondientes secuencias de proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E. coli*, *Rattus norvegicus*^l, humano^k o mitocondrias humanas^l. Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) con parámetros por defecto. *NP significa que no se identificaron residuos homólogos.

- a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27, 36-37.
- b) Número de acceso a Genbank AF034619
- 15 c) Número de acceso a Genbank J01695
- d) Número de acceso a Genbank 2624399
- e) Número de acceso a Genbank M11167
- f) Número de acceso a Genbank 13683
- g) Número de acceso a Genbank AAA86859 para la proteína L3; número de acceso a Genbank P12735 para la proteína L4; número de acceso a Genbank R5HS24 para la proteína L22.
- h) Indica un residuo que se halla dentro de distancia de ligazón a hidrógeno (3.5 Å) del ligando; por ejemplo, véase Jorgensen, WL, Nguyen, TB. (1993) J. Comput. Chem. 14:195-205.
- i) Número de acceso a Genbank CAA26460 para la proteína L3; número de acceso a Genbank CAA26461 para la proteína L4; número de acceso a Genbank CAA26465 para la proteína L22.
- 25 j) Número de acceso a Genbank P21531 para la proteína L3; número de acceso a Genbank JC4277 para la proteína L4; número de acceso a Genbank P24049 para la proteína L22.
- k) Número de acceso a Genbank NP_000958 para la proteína L3; número de acceso a Genbanks P36578, NP_000959, S39803, y T09551 para la proteína L4; número de acceso a Genbank XP_051279 para la proteína L22.
- l) Los residuos en contacto de van der Waals con el antibiótico se definen como aquellos residuos dentro de rmin de cualquier átomo en el antibiótico, en donde $r_{min} = 21/6s$ y es el mínimo en el potencial de pares de Lennard-Jones (ver: Computer Simulation of Liquids; Allen, M. P. y Tildesley, D. J.; Oxford University Press: New York, 1992, 11.). Los ss de Lennard-Jones se toman del campo de fuerzas de OPLS-AA (véase, por ejemplo Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S. y Tirado-Rives, J. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 11225-11236 y Jorgensen, W. L. BOSS, Versión 4.3; Yale University: New Haven, CT, 2002).
- 35 La Tabla 20A identifica los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen por lo menos una porción de un bolsillo de unión de linezólido (envuelta 5,8 angstroms). Además, la Tabla 20A identifica los correspondientes residuos que definen por lo menos una porción del bolsillo de unión de linezólido en *E. coli*, *Rattus*, humano, y subunidad grande de mitocondrias humanas. Por otra parte, en la Tabla 20B se identifican los residuos en la subunidad ribosómica *H. marismortui* 50S que conjuntamente definen una porción más amplia de un bolsillo de unión de linezólido (envuelta de 5,8 – 12,6 angstroms). Los residuos no conservados han sido
- 40 identificados como anteriormente descrito con respecto a las Tablas 5A y 5B.

Tabla 20A. Residuos que definen el bolsillo de unión de linezólido (envuelta de 5,8 Å)

ES 2 448 815 T3

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-rresp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
A2100 ^v	A2059	A3630	A3874	A1052
G2102 ^v	G2061	G3632	G3876	G1054
A2103 ^v	A2062	A3633	A3877	A1055
G2482 ^v	G2447	G4114	G4353	G1264
A2486 ^v	A2451	A4118	A4357	A1268
C2487 ^{h,v}	C2452	C4119	C4358	C1269
A2488 ^v	A2453	U4120	U4359	A1270
U2535 ^v	U2500	U4167	U4406	U1317
A2538 ^v	A2503	A4170	A4409	A1320
U2539 ^{h,v}	U2504	U4171	U4410	U1321
G2540 ^{h,v}	G2505	G4172	G4411	G1322
U2541 ^{h,v}	U2506	U4173	U4412	U1323
C2542 ^v	C2507	C4174	C4413	U1324
U2619 ^v	U2584	U4251	U4490	U1401
U2620 ^v	U2585	U4252	U4491	U1402

- Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta de 5,8 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la unidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8 angstroms con respecto a los átomos de linezólido, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr fueron determinados mediante la comparación de secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr^b con las secuencias correspondientes de ADN genómico que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f). Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) con parámetros por defecto.
- 5 a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27, 36-37.
- 10 b) Número de acceso a Genbank AF034619
- c) Número de acceso a Genbank J01695
- d) Número de acceso a Genbank 2624399
- e) Número de acceso a Genbank M11167
- 15 f) Número de acceso a Genbank 13683
- h) Indica un residuo que se halla dentro de la distancia de unión del hidrógeno (3,5 angstroms) del ligando; por ejemplo, véase Jorgensen, WL, Nguyen, TB. (1993) J. Comput. Chem. 14:195-205.
- v) Los residuos en contacto de van der Waals con el antibiótico se definen como aquellos residuos dentro de r_{min} de cualquier átomo en el antibiótico, en donde $r_{min} = 21/6s$ y es el mínimo en el potencial de pares de Lennard-Jones (ver: Computer Simulation of Liquids; Allen, M. P. y Tildesley, D. J.; Oxford University Press: New York, 1992, 11.). Los ss de Lennard-Jones se toman del campo de fuerzas de OPLS-AA (véase, por ejemplo Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S. y Tirado-Rives, J. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 11225-11236 y Jorgensen, W. L. BOSS, Versión 4.3; Yale University: New Haven, CT, 2002).
- 20

Tabla 20B. Residuos que también definen el bolsillo de unión de linezólido (envuelta de 5.8 Å- 12.6 Å)

ES 2 448 815 T3

Residuo <i>H. Marismortui</i>	Residuo co-resp. en <i>E. coli</i>	Residuo correspondiente en <i>Rattus</i>	Residuo correspondiente en humano	Residuo correspondiente en mitocondrias humanas
23S ARNr				
A631	A574	G1282	G1363	NP*
A632	A575	C1283	C1364	NP
C633	U576	G1284	G1365	NP
G2073	G2032	C3603	C3847	G1025
G2094	G2053	G3624	G3868	G1046
A2095	A2054	G3625	G3869	A1047
A2096	C2055	A3626	A3870	C1048
G2097	G2056	A3627	A3871	G1049
C2098	G2057	A3628	A3872	A1050
G2099	A2058	G3629	G3873	G1051
A2101	A2060	A3631	A3875	A1053
C2104	C2063	C3634	C3878	C1056
C2105	C2064	C3635	C3879	C1057
A2474	A2439	A4106	A4345	A1256
G2480	G2445	G4112	G4351	G1262
G2481	G2446	G4113	G4352	G1263
A2485	A2450	A4117	A4356	A1267
G2489	G2454	G4121	G4360	G1271
U2528	U2493	U4160	U4399	U1310
G2529	G2494	G4161	G4400	A1311
C2534	C2499	U4166	U4405	C1316
C2536	C2501	C4168	C4407	C1318
G2537	G2502	G4169	G4408	G1319
G2543	G2508	G4175	G4414	G1325
G2588	G2553	G4220	G4459	G1370
U2607	A2572	A4239	A4478	A1389
C2608	C2573	C4240	C4479	C1390
G2609	G2574	G4241	G4480	G1391
U2610	C2575	U4242	U4481	U1392
G2611	G2576	G4243	G4482	G1393
A2612	A2577	A4244	A4483	A1394
G2616	G2581	G4248	G4487	G1398

G2617	G2582	G4249	G4488	A1399
G2618	G2583	G4250	G4489	G1400
U2621	U2586	U4253	U4492	C1403
A2637	A2602	A4269	A4508	A1419
U2645	C2610	U4277	U4516	U1427
G2646	C2611	U4278	U4517	U1428
Proteína L3				
W242	Q150	W257	W257	G246

Los residuos que definen el bolsillo de unión (envuelta de 5,8 Å-12,6 Å) fueron determinados como aquellos residuos en la unidad ribosómica 50S que están situados dentro de 5,8-12,6 angstroms con respecto a los átomos de linezólido, para lo cual se utilizó el programa MIDAS^a. Los residuos conservados en 23S ARNr fueron determinados mediante la comparación de secuencias de la estructura de *H. marismortui* 23S ARNr^b con las secuencias correspondientes de ADN genómico que codifica el 23S ARNr homólogo (*E. coli*^c, *Rattus norvegicus*^d, humano^e o mitocondrias humanas^f). En los casos de proteínas ribosómicas, también se efectuaron comparaciones entre la secuencia estructural de la proteína de *H. marismortui* y las correspondientes secuencias de secuencias de proteínas alineadas que codifican proteínas homólogas en *E. coli*^g, *Rattus norvegicus*^h, humano^k o mitocondrias humanas^l. Las alineaciones de las secuencias fueron determinadas con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EE. UU.) con parámetros por defecto. *NP significa que no se identificaron residuos homólogos.

a) T. E. Ferrin, C.C. Huang, L. E. Jarvis, y R. Langridge (1988) "The MIDAS Display System" J. Mol. Graphics, 6 (1):13-27, 36-37.

b) Número de acceso a Genbank AF034619

15 c) Número de acceso a Genbank J01695

d) Número de acceso a Genbank 2624399

e) Número de acceso a Genbank M11167

f) Número de acceso a Genbank 13683

g) Número de acceso a Genbank AAA86859 para la proteína L3.

20 i) Número de acceso a Genbank CAA26460 para la proteína L3.

j) Número de acceso a Genbank P21531 para la proteína L3.

k) Número de acceso a Genbank NP_000958 para la proteína L3.

l) Número de acceso a Genbank P09001 para la proteína L3.

El experto en el arte, cuando se halla en posesión del sitio objetivo anteriormente mencionado o de otros, puede utilizar el proceso del diseño racional de fármacos para identificar moléculas que potencialmente se unen a uno o más de los sitios objetivo y/o inhiben la actividad ribosómica. Por otra parte, teniendo en cuenta cuáles residuos que definen el sitio objetivo se conservan entre los agentes patógenos pero no se conservan entre las especies huésped, el experto puede diseñar nuevos inhibidores de la síntesis de proteínas específicas para la especie. Es evidente que el experto en la materia puede aprovechar las regiones que no se conservan entre *E. coli* y de rata o humano a efectos de proveer regiones objetivo para un diseño racional de fármacos. A modo de ejemplo, la Figura 33 muestra determinadas regiones del túnel de salida de polipéptido que se conservan entre *E. coli* y rata o humano (indicado en rojo) y las regiones del túnel de salida de polipéptido que no se conservan entre *E. coli* y rata o humano (indicado en azul). Las Figuras 33(A) y 33(B) proveen vistas ampliadas de una gran subunidad ribosómica cuando se la corta en medio a lo largo del túnel de salida de polipéptido. La Figura 33(C) se provee para orientar al lector hacia la vista en la Figura 33 (A) con respecto a la gran subunidad ribosómica. La Figura 33(D) se provee para orientar el lector a la vista en la Figura 33B con relación a la gran subunidad ribosómica. Además, el experto, cuando se halle en posesión de mutaciones que impiden o reducen la actividad del antibiótico (es decir, están relacionadas con la resistencia a los antibióticos) puede utilizar esta información para modelar el producto de unión a antibiótico pertinente que luego puede ser utilizado como una base para el diseño racional de fármacos a efectos de identificar pequeñas moléculas que superan la resistencia a fármacos. Se contempla que es posible utilizar una variedad de

procedimientos de modelación por ordenador, por ejemplo protocolos de modelación de homología, para proveer un modelo de un sitio objetivo de resistencia a los medicamentos mediante la aplicación de mutagénesis dirigida a sitio de nucleótidos y/o aminoácidos y a continuación, utilizándose una minimización adecuada de la energía apropiada y protocolos de refinamiento.

5 c. Identificación de moléculas candidato

Se considera que es posible diseñar completamente *de novo* moléculas candidatas que inhiben la biosíntesis de proteínas, o que se las puede basar en un inhibidor preexistente de la biosíntesis de proteínas. Cualquiera de estos enfoques se puede facilitar mediante la selección por descarte mediante ordenador, de bases de datos y bibliotecas de moléculas pequeñas para entidades químicas, agentes, ligandos, o compuestos que se pueden unir en su totalidad, o en parte, a los ribosomas y a las subunidades ribosómicas, con mayor preferencia, a grandes subunidades ribosómicas, y con mayor preferencia aún subunidades ribosómicas 50S. En esta selección sistemática, la calidad del ajuste o calce de dichas entidades o compuestos al o a los sitios de unión puede ser juzgada ya sea por la complementariedad de la forma sea mediante la energía estimada de la interacción (Meng et al (1992) J. Comp Chem. 13: 505-524).

15 El diseño de moléculas que se unen a, o inhiben la actividad funcional de los ribosomas o de las subunidades ribosómicas de acuerdo con esta invención generalmente implica la consideración de dos factores. En primer lugar, la molécula ha de ser capaz de asociarse físicamente y estructuralmente con la gran subunidad ribosómica. Las interacciones moleculares no covalentes importantes en la asociación de los ribosomas y de las subunidades ribosómicas con la molécula, incluyen enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones hidrófobas. En segundo lugar, la molécula ha de ser capaz de adoptar una conformación que le permite asociarse con los ribosomas subunidades ribosómicas, con mayor preferencia, con las grandes subunidades ribosómicas, y con mayor preferencia aún con la unidad ribosómica 50S. Si bien es posible que determinadas porciones de la molécula no participen directamente en esta asociación con un ribosoma o con subunidades ribosómicas, dichas porciones todavía pueden influir sobre la conformación global de la molécula. Esto, a su vez, puede tener un impacto significativo en las afinidades de unión, la eficacia terapéutica, calidades de los fármacos, y su potencia. Tales requisitos conformacionales incluyen la estructura tridimensional global y la orientación de la entidad química o molécula en relación con la totalidad o con una porción del sitio activo u otra región de los ribosomas o subunidades ribosómicas, o el espaciamiento o separación entre los grupos funcionales de una molécula que comprende varios entidades químicas que interactúan directamente con los ribosomas o subunidades ribosómicas, con mayor preferencia, con las grandes subunidades ribosómicas, y con mayor preferencia aún con la unidad ribosómica 50S.

El efecto inhibitorio o de unión, potencial, predicho, de una molécula sobre ribosomas y sobre subunidades ribosómicas puede ser analizado antes de su síntesis real antes de las pruebas, mediante el uso de técnicas de modelación por ordenador. Si la estructura teórica de la molécula dada sugiere una interacción y asociación insuficientes entre ella y ribosomas o subunidades ribosómicas, se obvia la síntesis y el ensayo de la molécula. Sin embargo, si la modelación por ordenador indica una fuerte interacción, la molécula puede entonces ser sintetizada y se prueba su capacidad de interactuar con los ribosomas o subunidades ribosómicas y su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas. De esta manera, la síntesis de moléculas inoperantes puede ser evitada. En algunos casos, se sintetizan moléculas inactivas predichas en la modelación y seguidamente se las somete a ensayo para desarrollar una SAR (structure-activity relationship, relación entre estructura y actividad) para moléculas que interactúan con una región específica del ribosoma o de la subunidad ribosómica, con mayor preferencia, de la gran subunidad ribosómica, y con mayor preferencia aún de la unidad ribosómica 50S. Tal como se lo usa en la presente, el término "SAR", hará referencia colectivamente a las relaciones de propiedad estructura-actividad/estructura relativas a la(s) relación(es) entre la actividad y las propiedades de un compuesto y su estructura química.

d. Diseño de novo

45 Un experto en la técnica puede usar uno de varios métodos para identificar partes o entidades químicas, compuestos, u otros agentes en función de su capacidad de asociarse con un sitio objetivo preseleccionado dentro de una ribosoma o de una subunidad ribosómica. Este proceso puede comenzar mediante inspección visual o mediante modelación asistido por ordenador de, por ejemplo, el sitio objetivo en la pantalla de ordenador basado en las coordenadas atómicas de la unidad ribosómica 50S y/o sus complejos con otros análogos y antibióticos, registrados en el RCSB Protein Data Bank con números de acceso PDB; ID 1FFK, 1JJ2, 1FFZ, 1FG0, 1K73, 1K88, 1K8A, 1KD1, o 1K9M, y/o contenido en el Disco N.º 1. En una realización, en el diseño del compuesto se utilizan programas de modelación por ordenador que calculan cómo diferentes moléculas interactúan con los diversos sitios del ribosoma, de la subunidad ribosómica, o de un fragmento de los mismos. Seguidamente es posible posicionar partes o entidades químicas seleccionadas, compuestos seleccionados, o agentes seleccionados, en una variedad de orientaciones, o atracado, dentro de al menos una porción del sitio objetivo de un ribosoma o de una subunidad ribosómica, con mayor preferencia, de una gran subunidad ribosómica, e incluso con mayor preferencia, de una subunidad ribosómica 50S. Se dispone de bases de datos de estructuras químicas de, por ejemplo, Cambridge Crystallographic Data Center (Cambridge, Reino Unido) y de Chemical Abstracts Service (Columbus, OH). El acoplamiento puede realizarse usando software tal como Cerius, Quanta o Sybyl, seguido de minimización de energía y dinámica molecular con campos de fuerza de mecánica molecular estándar, tales como OPLSAA, CHARMM o AMBER.

Algunos programas de ordenador especializados también pueden ayudar en el proceso de la selección de entidades químicas. Los mismos incluyen sin limitación:

5 (1) GRID (Goodford, P. J., "A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules" (1985) *J. Med. Chem.* 28, 849-857). Un software tal como el GRID, que es un programa que determina probables sitios de interacción entre subunidades ribosómicas con diversas características de grupos funcionales y la superficie macromolecular, puede utilizarse para analizar los sitios de superficie a efectos de determinar estructuras de proteínas o moléculas similarmente inhibitoras. Los cálculos de GRID, con adecuados grupos inhibidores sobre moléculas (por ejemplo, aminas primarias protonadas) como la sonda, se utilizan para identificar potenciales lugares críticos alrededor de posiciones accesibles en niveles de contorno de energía adecuados. El GRID es provisto por Oxford University, Oxford, RU.

(2) MCSS (Miranker, A. y M. Karplus (1991) "Functionality Maps of Binding Sites: A Multiple Copy Simultaneous Search Method." *Proteins: Structure, Function and Genetics* 11: 29-34). El MCSS es provisto por Molecular Simulations, Burlington, MA.

15 (3) AUTODOCK (Goodsell, D. S. y A. J. Olsen (1990) "Automated Docking of Substrates to Proteins by Simulated Annealing" *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 8: 195-202). El AUTODOCK es provisto por Scripps Research Institute, La Jolla, CA.

(4) DOCK (Kuntz, I. D. et al. (1982) "A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions" *J. Mol. Biol.* 161: 269-288). El programa DOCK puede ser utilizado para analizar un sitio activo o un sitio de unión de ligando y sugiere ligandos con propiedades estéricas complementarias. El DOCK es provisto por la University of California, San Francisco, CA.

(5) ALADDIN (Van Drie et al. (1989) "ALADDIN: An Integrated Tool of Computer Assisted Molecular Design and Pharmacophore Recognition From Geometric, Steric and Substructure Searching of Three-Dimensional Structures" *J. Comp-Aided Mol. Des.* 3: 225).

25 (6) CLIX (Davie y Lawrence (1992) "CLIX: A Search Algorithm for Finding Novel Ligands Capable of Binding Proteins of Known Three-Dimensional Structure" *Proteins* 12: 31-41).

(7) GROUPEBUILD (Rotstein y Murcko (1993) "GroupBuild: A Fragment-Based Method for De Novo Drug Design" *J. Med. Chem* 36: 1700).

(8) GROW (Moon y Howe (1991) "Computer Design of Bioactive Molecules: A Method for Receptor-Based De Novo Ligand Design" *Proteins* 11: 314).

30 Una vez que se han seleccionado partes o entidades, compuestos o agentes, químicos adecuados, se los puede ensamblar en forma de una única molécula. El ensamble puede efectuarse mediante inspección visual y/o modelado por ordenador y análisis computacional de la relación espacial de las partes o entidades, compuestos o agentes, químicos, los unos con respecto a los otros en el espacio tridimensional. Esto podría ser seguido por la construcción de modelos usando software tal como Quanta o Sybyl.

35 Los programas útiles para ayudar al experto en la técnica en la interconexión de las entidades, compuestos o agentes, químicos individuales, incluyen sin limitación:

(1) CAVEAT (Bartlett, P. A. et al. (1989) "CAVEAT: A Program to Facilitate the Structure-Derived Design of Biologically Active Molecules". *Intermolecular Recognition in Chemical and Biological Problems*", Special Pub., Royal Chem. Soc. 78: 82-196) and (Bacon et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 225: 849-858). El CAVEAT utiliza bases de datos de compuestos cíclicos que pueden actuar como "separadores" para conectar cualquier cantidad de fragmentos químicos ya posicionados en el sitio activo. Esto permite a un experto en el arte generar rápidamente centenares de maneras posibles para interconectar los fragmentos ya conocidos o de los que se sospecha que son necesarios para una unión estrecha. El CAVEAT es provisto por la Universidad de California, Berkeley, CA.

45 (2) Sistemas de bases de datos 3D tales como MACCS-3D (MDL Information Systems, San Leandro, CA). Esta área ha sido objeto de una revisión en: Martin, Y. C., (1992) "3D Database Searching in Drug Design", *J. Med. Chem.* 35: 2145-2154.

(3) HOOK (provisto por Molecular Simulations, Burlington, MA.).

50 En lugar de construir una molécula de interés en etapas a razón de una entidad química por vez como arriba descrito, es posible diseñar la molécula de interés como un todo utilizándose un sitio activo vacío u opcionalmente con la inclusión de alguna o más porciones de uno o más inhibidores conocidos. El software que permite implementar estos métodos incluye:

(1) LUDI (Bohm, H.-J. (1992) "The Computer Program LUDI: A New Method for the De Novo Design of Enzyme Inhibitors" *J. Comp. Aid. Molec. Design* 6: 61-78). El programa LUDI puede determinar una lista de sitios de interaccionen los cuales colocar tanto los enlaces de hidrógeno como los fragmentos hidrófobos. El LUDI utiliza

seguidamente una biblioteca de aproximadamente 600 linkers para conectar hasta cuatro sitios de interacción en fragmentos. A continuación se utilizan grupos "de puenteo" más pequeños tales como -CH₂- y -COO- para conectar estos fragmentos. Por ejemplo, para la enzima DHFR, los fragmentos de grupos funcionales clave en el metotrexato, que es un inhibidor bien conocido, ha sido reproducido por LUDI. Véase también, Rotstein and Murcko, (1992) J. Med. Chem. 36:1700-1710. El LUDI es provisto por Biosym Technologies, San Diego, CA.

(2) LEGEND (Nishibata, Y. y A. Itai (1991) Tetrahedron 47, 8985). El LEGEND is provisto por Molecular Simulations, Burlington, MA.

(3) LeapFrog (provisto por Tripos Associates, St. Louis, MO.).

(4) Aladdin (provisto por Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA)

También es posible emplear otras técnicas de modelación molecular de acuerdo con la presente invención. Véase, por ejemplo Cohen, N. C. et al. (1990) "Molecular Modeling software and Methods for Medicinal Chemistry, J. Med. Chem. 33: 883-894. Véase también, Navia, M. A. y M. A. Murcko (1992) "The Use of Structural Information en Drug Design", Curr. Opinions in Structural Biology 2: 202-210; y Jorgensen (1998) "BOSS- Biochemical and Organic Simulation System" en the Encyclopedia of Computational Chemistry (P.V.R. Schleyer, ed.) Wiley & Sonstra., Athens, U.S.A. 5: 3281-3285).

Se considera que durante la modelación puede ser necesario introducir en la molécula de interés partes químicas que pueden ser beneficiosas para una molécula que ha de ser administrada como un producto farmacéutico. Por ejemplo, puede ser posible introducir en la molécula de interés, u omitir de la misma, partes químicas que posiblemente no influyan directamente sobre el enlace de la molécula al área objetivo pero que contribuyan, por ejemplo, a la solubilidad general de la molécula en un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable, a la biodisponibilidad de la molécula y/o a la toxicidad de la molécula. Pueden encontrarse consideraciones y métodos para optimizar la farmacología de la molécula de interés, por ejemplo en: "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics" Eighth Edition (Goodman, Gilman, Rall, Nies, & Taylor (eds.)). Pergaman Press (1985); Jorgensen & Duffy (2000) Bioorg. Med. Chem. Lett. 10: 1155-1158.

Por otra parte, puede utilizarse el programa de ordenador "Qik Prop" para obtener predicciones rápidas en cuanto a descripciones físicamente significativas y en cuanto a las propiedades farmacéuticamente relevantes de una molécula orgánica de interés. Es posible utilizar un esquema de probabilidad de "regla de cinco" para estimar la absorción oral de los compuestos recién sintetizados (Lipinski et al. (1997) Adv. Drug Deliv. Rev. 23:3).

Los programas adecuados para la selección y diseño de agentes farmacóforos incluyen:

(1) DISCO (Abbot Laboratories, Abbot Park, I11.).

(2) Catalyst (Bio-CAD Corp., Mountain View, CA).

(3) Chem DBS-3D (Chemical Design Ltd., Oxford, R.U.).

Por otra parte, la persona experta puede utilizar la información disponible acerca de cómo diseñar compuestos terapéuticamente activos y compuestos farmacéuticamente útiles, adecuados, y utilizar esta información en el diseño de los novedosos inhibidores inventivos de la síntesis de proteínas. Véase, por ejemplo, Lipinski et al. (1997) Ad. Drug Deliv. Reviews 23: 3-25; Van de Waterbeemd et al. (1996) Quantitative Structure-Activity Relationships 15: 480-490; y Cruciani et al. (2000), Theochem-J. Mol. Struct. 503: 17-30.

El ingreso de las coordenadas de las proteínas y ARNs del ribosoma o de la subunidad ribosómica en los programas de ordenador expuestos en lo que precede tiene como resultado el cálculo de la estructura más probable de la macromolécula, inclusive las coordenadas atómicas globales de un ribosoma, de una subunidad ribosómica o de un fragmento de los mismos. Es posible combinar y refinar estas estructuras mediante cálculos adicionales en los que se utilizan dichos programas para determinar la estructura tridimensional, probable o real, del ribosoma, unidad ribosómica o sitios de enlace, de los ligandos.

e. Modificación de moléculas existentes

En lugar de diseñar moléculas de interés completamente *de novo* se considera que es posible utilizar moléculas preexistentes o proteínas de las mismas como punto de partida para el diseño de un nuevo candidato. Se considere que muchos de los enfoques útiles para diseñar moléculas *de novo* también pueden ser útiles para modificar moléculas existentes.

Se considera que el conocimiento de una relación espacial entre un inhibidor de la biosíntesis de las proteínas, por ejemplo, un antibiótico, y de sus respectivos sitios de ligazón dentro de un ribosoma, permite el diseño de inhibidores modificados que pueden tener mejores propiedades de ligazón, por ejemplo, una mayor afinidad de ligazón y/o carácter específico, con respecto a la molécula a partir de la cual ha sido derivado. Como alternativa, el conocimiento de sitios de contacto de inhibidor dentro de un ribosoma permite la síntesis de una nueva molécula que contiene, por ejemplo, una porción de una primera molécula (por ejemplo, un antibiótico o análogo o derivados de la misma) que se liga al sitio de contacto y a otra porción que contribuye que aporta una funcionalidad adicional.

Se considera que es posible diseñar una variedad de moléculas modificadas (por ejemplo, antibióticos modificados) mediante las coordenadas atómicas provistas en la presente. Por ejemplo, se considera que conociendo la relación espacial de uno o más de los antibióticos con respecto a la gran subunidad ribosómica es posible generar nuevas moléculas basadas en antibióticos. Las coordenadas atómicas de cada antibiótico con respecto a la gran subunidad ribosómica proveen información acerca de cuáles porciones del ribosoma o subunidad ribosómica y del antibiótico entran en contacto entre sí. En consecuencia, a partir de esta información el experto en la técnica no sólo puede identificar las ubicaciones de contacto dentro de los ribosomas que puede ser utilizada para el diseño de fármacos *de novo*, como se expuso anteriormente, sino que también puede identificar porciones de un antibiótico que actúan como un dominio de unión a ribosoma.

Sobre la base de la información provista en la presente, el experto en la técnica puede identificar fácilmente y producir antibióticos híbridos que comprenden un dominio de unión a ribosoma de un primer antibiótico o un análogo o derivado del mismo y un dominio de unión a ribosoma de un segundo antibiótico, diferente, o un análogo o un derivado del segundo. Los antibióticos híbridos resultantes se unen preferentemente al mismo tiempo a cada una de las ubicaciones de contacto respectivas dentro de la subunidad ribosómica. Las coordenadas atómicas provistas en la presente permiten al experto en la materia identificar antibióticos candidatos que pueden ser usados como plantillas en la síntesis de un híbrido, y también proveen la información necesaria para producir químicas de unión de manera tal que cada dominio de unión a ribosoma está orientado correctamente con respecto a su respectivo sitio de contacto. Como resultado de ello, se contempla que el experto en la técnica puede producir un antibiótico híbrido que se une a un ribosoma o subunidad ribosómica con una afinidad mayor y/o tiene una actividad inhibidora de la síntesis de las proteínas, que son mayores que las de cualquiera de los antibióticos plantilla individuales utilizados para generar el híbrido. Como alternativa, el antibiótico híbrido puede superar la resistencia de fenotipos que pueden haberse desarrollado contra cualquiera de los antibióticos plantilla. Por ejemplo, la proximidad del sitio ocupado por la parte disacárido de la carbomicina al sitio ocupado por anisomicina sugiere que un compuesto híbrido que incluye porciones tanto de carbomicina como de anisomicina puede ser un inhibidor eficaz de la síntesis de las proteínas.

Además, las coordenadas atómicas provistas en la presente permiten al experto en la materia utilizar la información necesaria para identificar un dominio de unión a ribosoma y diseñar otros tipos de inhibidores de la síntesis de las proteínas. Por ejemplo, con una comprensión de la región de contacto de ribosoma y del entorno circundante el experto en la técnica puede proveer nuevas moléculas, una porción de las cuales se basa en la región de unión a antibiótico (dominio de unión) y otra porción de la cual (el dominio efector) puede ser diseñada como un novedoso dominio de llenado de espacio que inhibe estéricamente o interrumpe la biosíntesis de las proteínas dentro de los ribosomas o la secreción a través del túnel de salida de polipéptido. Por ejemplo, la experto en el arte puede combinar la región de unión a ribosoma del antibiótico, tilosina o un análogo o derivado del mismo, que se une a un lado de la salida del túnel de polipéptido cerca del sitio de peptidiltransferasa, con, por ejemplo, una novedosa parte química no presente en los antibióticos identificados hasta la fecha que sea lo suficientemente voluminoso para bloquear el túnel de salida de polipéptido. Sin embargo, se contempla que el experto en la materia puede aprovechar una o más de las muchas regiones de contacto de antibióticos descritas en la presente, para diseñar dominios de unión y efectoras totalmente nuevas.

Es preferible que los inhibidores resultantes de la síntesis de proteínas tengan un peso molecular no superior a aproximadamente 1.500, con mayor preferencia, no superior a aproximadamente 1.000, con mayor preferencia, no superior a 750 y, con mayor preferencia, aun, no superior a aproximadamente 500. Los inhibidores de la síntesis de proteínas tienen preferiblemente un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 250 a aproximadamente 1.500, y con mayor preferencia, en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 1.200. Además, los inhibidores de la síntesis de proteínas tienen una concentración de inhibidor mínima preferentemente no mayor que 50 mM, con mayor preferencia, no mayor que 10 mM, y más preferentemente aun, no mayor de 1 mM para inhibir la actividad de 50% (CI₅₀) en un ensayo biológico, por ejemplo, en un ensayo in vitro de traducción, por ejemplo, un ensayo de traducción de *E. coli*. Los inhibidores de la síntesis de proteínas tienen preferiblemente una IC₅₀ en el intervalo de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 50 mM, o en el intervalo de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 10 mM, o en el intervalo de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 mM.

- Por otra parte, la presente invención permite que el experto en la materia diseñe moléculas, por ejemplo, inhibidores de la síntesis de proteínas selectivos adaptados para ser más potentes con respecto a los ribosomas de un organismo objetivo, por ejemplo, un agente patógeno tal como un microbio, y menos potente, es decir, menos tóxico, para los ribosomas de un organismo no objetivo, por ejemplo, un organismo huésped tal como un ser humano.
- 5 Además, la invención permite al experto en la materia utilizar las coordenadas atómicas y las estructuras de la gran subunidad ribosómica y sus complejos con inhibidores de la síntesis de proteínas para diseñar modificaciones en los compuestos de partida, tales como un antibiótico, que se unirán más estrechamente a un ribosoma objetivo (por ejemplo, la unidad ribosómica 50S de las bacterias) y menos fuertemente a un ribosoma no objetivo (por ejemplo, la subunidad ribosómica humana 60S o al ribosoma de mitocondrias humanas¹).
- 10 La estructura de un complejo entre la gran subunidad grande ribosómica y el compuesto de partida (por ejemplo, tilosina u otro inhibidor de la síntesis de las proteínas) también se puede utilizar para guiar la modificación de dicho compuesto a efectos de producir nuevos compuestos que tengan otras propiedades deseables para fines industriales y otros (por ejemplo, en forma de productos farmacéuticos, herbicidas o insecticidas), tales como estabilidad química, solubilidad o permeabilidad de la membrana.
- 15 Una variedad de antibióticos se une a la gran subunidad ribosómica y deshace la síntesis de proteínas, e incluyen miembros de las familias de antibióticos que incluyen, sin limitación, cloranfenicoles, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, altiomocinas oxazolidinonas, análogos de nucleótidos, tioestreptones (inclusive la familia de las micrococcinas), péptidos, glutarimidas, tricotecenos, TAN-1057, pleuromutilinas, higromicinas, betacinas, evernimocinas, boxazomicinas y fusidanos.
- 20 Los miembros de la familia del cloranfenicol incluyen, por ejemplo, cloranfenicol e ilodoanfenicol. Los miembros de la familia de los macrólidos incluyen, por ejemplo, Biaxin (Clarithromicina), Zithromax (Azitromicina; azalida), Ketek (Telitromicina, cetólido), ABT-773, tilosina, espiramicina I, espiramicina II, espiramicina III, eritromicina A, carbomicina A, telitromicinam methmicina, narbomicina, Lankamicina, Oleandomicina, Megalomicina, Chalcomicina, Niddamicina, Leucomicina, Angolamicina, Picromicina, y Relomicina. Los miembros de la familia de la lincosamida incluyen, por ejemplo, Clindamicina y Lincomicina. Los miembros de la familia de la estreptogramina incluyen, por ejemplo, estreptogramina A, estreptogramina B, Ostreogricina G, Sinercida, Virginiamicina S1, Virginiamicina S2, Virginiamicina S3, Virginiamicina S4, Vernamicina B, Vernamicina C, Patricina A, y Patricina B. Un miembro de la familia de la altiomocina, incluye, por ejemplo, Altiomicina. Los miembros de la familia de la oxazolidinona incluyen, por ejemplo, Linezolid, Eprezolid y DuP721. Los miembros de la familia de los análogos de nucleótidos incluyen, por ejemplo, Esparsomicina, Puomicina, Anisomicina y Blastidina S. Los miembros de la familia de la tioestreptona incluyen, por ejemplo, Tioestreptona, Siomicina, Esporangiomocina, Micrococcina M1, Micrococcina P y Tiopeptina. Los miembros de la familia de los péptidos incluyen, por ejemplo, Viomicina, Capreomicina IA, Capreomicina IB, Capreomicina IIA, y Capreomicina IIB. Los miembros de la familia de los glutarimidas incluyen, por ejemplo, Cicloheximida, Estreptovitacina, Estreptimidona, Inactona, Actiphenol. Los miembros de la familia de los tricótesenos incluyen, por ejemplo, Tricodermina, Tricodermol, Tricodermona, Vomitoxina, toxina T-2, Tricothecina, Nivalenol y Verrucarina A. Tan-1057 incluye Tan-1057A, Tan-1057B, Tan- 1057C, y Tan-1057D. Las pleuromutilinas incluyen, por ejemplo, Pleuromutilina, Tiamulina, Azamulina y Valnemulina. La higromicina incluyen los antibióticos Higromicina A. Las betacinas incluyen, por ejemplo, la familia de los productos naturales de betacina y VCR4219. Las evernimocinas incluyen, por ejemplo, Ziracina, Avilamicina, Evernimicina y Curamicina. Las boxazomicinas incluyen, por ejemplo, Boxazomicina A y B. Los fusidanos incluyen, por ejemplo, ácido fusídico y 17S, ácido S-dihidrofusídico dietilenglicol hidrato.

Los inhibidores pueden ser difundidos en, o empapados con, los cristales estabilizados de la gran subunidad ribosómica tal como se describe en los Ejemplos 4 y 5 de manera de formar un complejo con la gran subunidad ribosómica para recolectar datos de difracción de rayos-X. Como alternativa, los inhibidores pueden ser cocrystalizados con la gran subunidad ribosómica mezclando el inhibidor con la gran subunidad ribosómica antes de su precipitación mediante un elevado contenido de sal.

A partir de la estructura del ribosoma de *H. marismortui*, la estructura del ribosoma de un organismo no objetivo (por ejemplo, la subunidad ribosómica 60S humana) puede ser construida mediante modelación por homología, es decir, cambiando la estructura de los residuos a un sitio objetivo de interés para los residuos en las mismas posiciones del ribosoma no objetivo. Esto se puede lograr mediante la eliminación computacional de las cadenas laterales del ribosoma de la estructura conocida y su sustitución por las cadenas laterales de la estructura desconocida colocadas en posiciones estéricamente plausibles. De esta manera, se puede entender cómo difieren las formas de los sitios objetivo dentro de los ribosomas apuntados y no apuntados. Este proceso, por lo tanto, provee información concerniente a cómo una molécula que se une al sitio objetivo puede ser alterada químicamente a efectos de producir moléculas que se unirán fuerte y específicamente a los ribosomas objetivo, pero a los que al mismo tiempo se les impide unirse al ribosoma no objetivo. Del mismo modo, el conocimiento de las porciones de las moléculas unidas que se enfrentan al solvente, permiten la introducción de otros grupos funcionales para fines farmacéuticos adicionales. El proceso del modelado de estructuras por homología también se puede utilizar para comprender los mecanismos mediante los cuales los ribosomas mutantes se vuelven resistentes a los efectos de los productos farmacéuticos o pesticidas, tales como los herbicidas o insecticidas. Además, con el conocimiento de las porciones de la subunidad ribosómica que interviene en la resistencia a fármacos, el experto en la técnica puede diseñar nuevas moléculas que superan el problema de la resistencia a los fármacos. La utilización del modelado de

estructuras por homóloga para diseñar moléculas que se unen más estrechamente al ribosoma objetivo que al ribosoma no objetivo tiene una aplicabilidad de amplia difusión. Los métodos descritos en la presente se pueden utilizar para controlar cualquier organismo objetivo, por ejemplo, un agente patógeno, mediante el diseño de moléculas que inhiben grandes subunidades ribosómicas de los organismos objetivo y que al mismo tiempo no inhiben la subunidad ribosómica 50S o 60S del organismo no objetivo, por ejemplo, un huésped, en la misma amplitud o no en absoluto. Las moléculas identificadas o preparadas mediante los métodos de la presente invención se pueden usar para controlar organismos específicos, a pesar de tener poco o ningún efecto adverso sobre el organismo no apuntado. Por lo tanto, las moléculas identificadas o desarrolladas utilizando los métodos de la presente invención se pueden diseñar de manera tal que su administración mata los organismos objetivo o inhibe algún aspecto de las funciones biológicas de los organismos objetivo y al mismo tiempo no tienen un efecto similar en el organismo no apuntado. Los efectos adversos del agente sobre los organismos objetivo pueden incluir, sin limitación, la muerte del organismo objetivo; la desaceleración de los índices de crecimiento; ralentizar o eliminar el paso de una fase de crecimiento a otra (por ejemplo, por el hecho de extender la etapa de crecimiento de las larvas); la desaceleración o la eliminación de la reproducción, la disminución o la prevención del apareamiento, la disminución o eliminación de la producción de crías, la limitación o eliminación de aumentos de peso corporal de los organismos apuntados; la disminución o eliminación de la capacidad y comportamientos relacionados con la alimentación; y la alteración o destrucción de las funciones celulares, de tejidos y/u órganos.

Los novedosos agentes abarcados por la presente invención pueden ser útiles como herbicidas, pesticidas (por ejemplo, insecticidas, nematocidas, rodenticidas, etc.), acaricidas, o agentes antimicrobianos (por ejemplo, antifúngicos, antibacterianos, antiprotozoarios, etc.) con respecto a organismos objetivo específicos. Por ejemplo, los novedosos agentes pueden ser apuntados a nematodos parásitos de plantas y animales, organismos procariotas (microbios causantes de enfermedades), y a plagas multicelulares eucariotas. Los ejemplos específicos de plagas multicelulares incluyen sin limitación, insectos, hongos, bacterias, nematodos, ácaros y garrapatas, agentes patógenos protozoarios, trematodos hepáticos parásitos de animales, y similares.

Los herbicidas, pesticidas, acaricidas, y agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas mediante la interacción con ribosomas son conocidos por el experto en la materia. Algunos ejemplos se exponen a continuación. Estos agentes conocidos se pueden modificar para obtener agentes novedosos mediante el uso de técnicas de modelado por ordenador y el conocimiento de la estructura de los ribosomas y de las subunidades ribosómicas y de la estructura de los complejos de ribosoma/ subunidad ribosómica/agente.

El cetólido ABT-773 se une a los ribosomas de manera más ajustada que la eritromicina en *S. pneumoniae* y es capaz de derrotar a la resistencia a los macrólidos en las bacterias (Capobianco et al (2000) Antimicrob Agents Chemother 44 (6): 1562/67). Las herramientas y metodologías de la presente invención se pueden utilizar para obtener derivados de eritromicina que se unen a los ribosomas o a subunidades ribosómicas con más fuerza que la con que se unen a los ribosomas y subunidades ribosómicas de animales no objetivo. Las bacterias objetivo pueden ser cualquier bacteria infecciosa, en particular *S. pneumoniae*, y aún más particularmente *S. pneumoniae* resistente a la eritromicina. Los animales no objeto pueden ser cualquier animal, particularmente mamíferos, e incluso más particularmente, seres humanos.

Los ejemplos de antibióticos que son inhibidores de la síntesis de las proteínas incluyen sin limitación: puromicina, cicloheximida, cloranfenicol, tetraciclina, y estreptomina (Heldt (1996) Plant Biochemistry and Molecular Biology 21.2: 458-464). La puromicina, como se expuso en lo que precede, se une como un análogo de una aminoacil-ARNt al sitio An y se añade a las cadenas de péptidos nacientes, y, evita etapas adicionales de elongación en procariotas y eucariotas. La cicloheximida inhibe la peptidiltransferasa en ribosomas eucariotas. El cloranfenicol inhibe la peptidiltransferasa en ribosomas procariotas. La tetraciclina se une a la subunidad 30S e inhibe la unión de aminoacil-tARN a los ribosomas procarióticos mucho más que a los eucariotas. La estreptomina interactúa con los ribosomas 30S lo que se traduce en un reconocimiento incorrecto de las secuencias de ARNm y por lo tanto inhibe la iniciación en los ribosomas procariotas. La Patente de EE. UU. N ° 5.801.153 divulga antibióticos contra agentes patógenos. Los aminoglucósidos son ejemplos de antibióticos antibacterianos que parecen inhibir la síntesis de proteínas. Sin embargo, hay una limitación para su uso debido a sus propiedades citotóxicas y nefrotóxicas. El sulfato de ampicilina, sulfato de frameticina, sulfato de gentamicina, sulfato de canamicina, sulfato de neomicina, sulfato de netilmicina, sulfato de paromomicina, sulfato de sisomicina, tobramicina, clorhidrato de vancomicina, y sulfato de viomicina son los miembros de la familia de los aminoglicósidos. Las herramientas y metodologías de la presente invención se pueden utilizar para obtener derivados de cualquier antibiótico de elección de manera de inhibir la síntesis de proteínas de los organismos objeto en un grado mayor con que inhiben la síntesis de proteínas de organismos no objetivo, tales como los seres humanos.

Los ejemplos de organismos objetivo y no objetivo incluyen sin limitación los provistos en la Tabla 21.

Tabla 21

<u>Ejemplos de clases de moléculas que pueden ser identificadas y/o desarrolladas mediante los métodos de la invención y organismos objetivo/no objetivo aplicables</u>		
Tipo de molécula	Organismos objetivo	Organismos no objetivo
Herbicidas		Plantas monocotiledóneas
Herbicidas	Céspedes	Soja, papa, café
Insecticidas	Moscas, ácaros	Abejas melíferas
Plaguicidas	Garrapatas	Venado
Plaguicidas	Piojos	Aves
Acaricidas	Ácaros parasitarios (sarna)	Perros
Agentes antimicrobianos (agentes antibacterianos)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Humanos
Agentes antimicrobianos (agentes antibacterianos)	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Escherichia coli</i>
Agentes antimicrobianos (agentes antifúngico)	<i>Erysiphe graminis</i>	Cebada
Agentes antimicrobianos (agentes antiprotozoarios)	<i>Toxoplasma gondii</i>	Animales
Venenos (rodenticidas)	Ratas	Perros, gatos, humanos

5 Se considera que las herramientas y metodologías de la presente invención se pueden utilizar para obtener inhibidores de la síntesis de proteínas de insectos objetivo, tales como gusanos de cápsula y mosquitos, en mayor grado con que inhiben la síntesis de proteínas de insectos no apuntados, tales como los escarabajos de la familia *Coccinellidae* (por ejemplo, mariquitas) y *Apis mellifera* (abejas). Otros insectos objetivo incluyen, sin limitación, insectos seleccionados de los órdenes *Coleoptera* (escarabajos), *Diptera* (moscas, mosquitos), himenópteros (avispa, hormigas, moscas de sierra), lepidópteros (mariposas y polillas), *Mallophaga* (piojos), *Homoptera* (moscas blancas, pulgones), hemípteros (chinchas), *Orthoptera* (langostas, cucarachas), *Thysanoptera* (trips), *Dermaptera* (tijeretas), *Isoptera*, Anopluros, *Siphonaptera* y *Trichoptera* (moscas caddis).

10 Además, se considera que las herramientas y metodologías de la presente invención se pueden utilizar para obtener inhibidores de la síntesis de proteínas de plantas objetivo que inhiben la síntesis de proteínas de las plantas objetivo más de lo que inhiben la síntesis de proteínas de plantas y animales no objetivo. Las plantas objetivo pueden ser cualquier especie de plantas no deseadas, en particular las malas hierbas particulares, e incluso más particularmente malas hierbas perjudiciales. El que una planta en particular sea una mala hierba dependerá del contexto en el que está creciendo. Por ejemplo, las plantas no deseadas *Zea mays* (maíz) que crecen en un campo de *Glycine max* (soja) podrían ser consideradas malas hierbas no deseadas. Los ejemplos de malas hierbas que son plantas objetivo probables incluyen sin limitación: *Allium vineale* (ajo silvestre), *Bromus tectorum* (bromo veloso), *Triticum cylindricum* (césped de cabra articulado), *Amaranthus spp.* (maleza porcina), *Chenopodium album*, *Avena fatua* (avena silvestre), *B. secalinus*, *Echinochloa crus-galli* (pata de gallo), *Alopecurus myosuroides*, *Setaria faberii* (cola de zorra gigante), *Xanthium strumarium* (cadillo común), *Ambrosia artemisiifolia* (ambrosia común), e *Ipomoea spp.* (campanillas). Los organismos no objetivo pueden ser de cualquier planta, particularmente cualquier planta deseable, y aún más particularmente cualquier planta de cultivo. Los organismos no objetivo también pueden ser animales cualesquiera, particularmente mamíferos, e incluso y más particularmente en seres humanos. En una realización preferida, las herramientas y las metodologías de la presente invención se pueden utilizar para producir inhibidores de la síntesis de proteínas que matan o lesionan una o más especies de malas hierbas nocivas, pero que no dañan plantas y los animales no objeto.

15 Las bacterias de interés incluyen sin limitación: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria monocytogenes*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Francisella tularensis*, *Pasteurella multocida*, *Vibrio cholerae*, *Flavobacterium meningosepticum*,

Pseudomonas mallei, *Pseudomonas pseudomallei*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Calymmatobacterium granulomatis*, *Streptobacillus moniliformis*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium aviumintracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia recurrentis*, *Actinomyces israelii*, *Nocardia asteroides*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Pneumocystis carinii*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Cryptococcus neoformans*.

Una vez que una molécula candidata ha sido diseñada o seleccionada mediante los métodos anteriormente descritos, la afinidad con la que esta molécula puede unirse al ribosoma o a la subunidad ribosómica puede ser sometida a ensayo y optimizada mediante evaluación computacional y/o mediante ensayos de actividad biológica después de sintetizar el compuesto. Las moléculas candidatas pueden interactuar con los ribosomas o subunidades ribosómicas en más de una conformación cada una de las cuales tiene una energía global de unión similar. En estos casos, la energía de deformación del enlace puede ser considerada como la diferencia entre la energía de la molécula libre y la energía promedio de las conformaciones observadas cuando la molécula se une a los ribosomas o a las subunidades ribosómicas, con mayor preferencia, a las grandes subunidades ribosómicas, y con mayor preferencia aún a las unidades ribosómicas 50S.

Una molécula diseñada o seleccionada para su unión a un ribosoma o subunidad ribosómica puede estar además por ordenador optimizada de manera que en su estado ligado carece preferiblemente de una interacción electrostática repulsiva con respecto a la región objetivo. Dichas interacciones no complementarias (por ejemplo, electrostáticas) incluyen interacciones carga-carga repulsiva, dipolo-dipolo y carga-dipolo. Específicamente, la suma de todas las interacciones electrostáticas entre el inhibidor y la enzima, cuando el inhibidor está unido al ribosoma o a la subunidad ribosómica, efectúan preferentemente un aporte neutro o favorable a la entalpía de unión. También es posible diseñar compuestos de unión débil mediante estos métodos a efectos de determinar el SAR.

En la técnica se dispone de programas informáticos específicos que pueden evaluar una energía de deformación y la interacción electrostática de un compuesto. Los ejemplos de programas adecuados incluyen: Gaussian 92, revision C (M. J. Frisch, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA.); AMBER, version 4.0 (P. A. Kollman, University of California at San Francisco, CA); QUANTA/CHARMM (Molecular Simulations, Inc., Burlington, MA); OPLS-AA ("OPLS Force Fields." W.L. Jorgensen. Encyclopedia of Computational Chemistry, Schleyer, Ed.; Wiley: New York, 1998; Vol. 3, pp 1986-1989) e Insight II/Discover (Biosystem Technologies Inc., San Diego, CA). Estos programas pueden implementarse, por ejemplo, utilizando una estación de trabajo Silicon Graphics, IRIS 4D/35 o una estación de trabajo IBM RISC/6000 modelo 550. Otros sistemas de hardware y paquetes de software son conocidos por los expertos.

Una vez que una molécula de interés ha sido seleccionada o diseñada, como arriba descrito, pueden efectuarse seguidamente sustituciones en algunos de sus átomos o grupos laterales con el fin de mejorar o modificar sus propiedades de unión. Por lo general, las sustituciones iniciales son conservadoras, es decir, el grupo de reemplazo se aproximará al mismo tamaño, forma, carácter hidrófobo y carga que el grupo original. Por supuesto, debe entenderse que los componentes conocidos en la técnica por alterar la conformación deben ser evitados. Tales compuestos químicos sustituidos se pueden analizar seguidamente para establecer la eficiencia de su ajuste al ribosoma o subunidad ribosómica mediante los mismos métodos de computación descritos en detalle, en lo que precede.

Además, los ligandos relacionados con ribosomas reales, complejos o miméticos se pueden cristalizar y analizar mediante difracción de rayos X. Las coordenadas del patrón de difracción se utilizan de manera similar para calcular la interacción tridimensional de un ligando y el ribosoma, subunidad ribosómica, o un mimético, a efectos de confirmar el ligando se unen a, o cambia la conformación de, un sitio en particular en el ribosoma o subunidad ribosómica, o en donde el mimético tiene una estructura tridimensional similar a la de un ribosoma, subunidad ribosómica o un fragmento de los mismos.

3. Síntesis de moléculas líder

Una molécula líder de la presente invención puede ser sin limitación, al menos uno seleccionado entre un lípido, un ácido nucleico, péptido, molécula pequeña inorgánica u orgánica, compuesto químico, elemento, sacárido, isótopo, carbohidratos, agente de formación de imágenes, lipoproteína, glicoproteína, enzima, sonda analítica, y un anticuerpo o fragmento de éste, cualquier combinación de cualquiera de los anteriores, y cualquier modificación química o variante de cualquiera de los anteriores. Además, una molécula líder puede comprender opcionalmente una etiqueta detectable. Tales etiquetas incluyen sin limitación etiquetas enzimáticas, radioisótopos o compuestos o elementos radiactivos, compuestos fluorescentes o metales, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. Los métodos bien conocidos pueden ser utilizados para la fijación de una etiqueta detectable de este tipo a una molécula líder.

Los métodos útiles para sintetizar moléculas líder tales como lípidos, ácidos nucleicos, péptidos, moléculas pequeñas inorgánicas u orgánicas, compuestos químicos, elementos, sacáridos, isótopos, carbohidratos, agentes de formación de imágenes, lipoproteínas, glicoproteínas, enzimas, sondas analíticas, anticuerpos y fragmentos de

anticuerpos, son bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen el enfoque tradicional de la síntesis de una molécula líder de este tipo, tal como un único péptido definido, a la vez, así como también la síntesis combinada de múltiples moléculas líder en un uno o más recipientes. Estas múltiples moléculas líder pueden incluir una o más variantes de una molécula líder previamente identificada. Los métodos para la síntesis combinada de múltiples moléculas líder son particularmente útiles en la preparación de bibliotecas combinatorias, que se pueden utilizar en técnicas de selección sistemática conocidos en la técnica.

A modo de ejemplo, es bien conocido en la técnica que es posible sintetizar múltiples péptidos y oligonucleótidos de forma simultánea. Las moléculas líder que son pequeños péptidos de hasta 50 aminoácidos de longitud se pueden sintetizar usando procedimientos estándar en fase sólida para la síntesis de péptidos, por ejemplo mediante procedimientos similares a los descritos en Merrifield (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149. Por ejemplo, durante la síntesis, los aminoácidos N-protectados que tienen cadenas laterales protegidas se añaden paso a paso a una cadena creciente de polipéptidos unida por su extremo C-terminal a un soporte polimérico insoluble, por ejemplo, perlas de poliestireno. Los péptidos se sintetizan uniendo un grupo amino de un aminoácido N-desprotectado a un grupo carboxi de un aminoácido N-protectado que ha sido activado haciéndolo reaccionar con un reactivo tal como dicitclohexilcarbodiimida. La fijación de un grupo amino libre al carboxilo activado conduce a la formación del enlace péptido. Los grupos protectores N-(más comúnmente utilizados incluyen Boc que es lábil en medio ácido y Fmoc que es lábil en medio básico).

En pocas palabras, el aminoácido C-terminal N- α -protectado se une en primer lugar a las perlas de poliestireno. Seguidamente se retira el grupo protector N- α . El grupo amino desprotectado se acopla al grupo α -carboxilato activado del siguiente aminoácido N- α -protectado. El proceso se repite hasta que se sintetice el péptido deseado. Los péptidos resultantes se desdoblan del soporte polimérico insoluble y de las cadenas laterales de aminoácidos desprotectados. Los péptidos más largos, por ejemplo con una longitud superior a 50 aminoácidos, típicamente se derivan por condensación de fragmentos peptídicos protegidos. Los detalles de la parte química apropiada, resinas, grupos protectores, aminoácidos protegidos y reactivos, son bien conocidos en la técnica y por tanto no se exponen en detalle en la presente. Véase por ejemplo, Atherton et al. (1963) *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press), y Bodanszky (1993) *Peptide Chemistry, A Practical Textbook*, 2nd Ed. Springer-Verlag, y Fields et al. (1990) *Int. J. Peptide Protein Res.* 35:161-214.

La purificación del péptido resultante se lleva a cabo utilizando procedimientos convencionales, tales como HPLC preparativa, por ejemplo, de permeación en gel, partición y/o cromatografía de intercambio iónico. La elección de matrices y tampones apropiados es bien conocida en la técnica y por tanto no se describen en detalle en la presente.

Se considera que un péptido sintético de acuerdo con la invención puede comprender aminoácidos de origen natural, aminoácidos no naturales, y/o aminoácidos que tienen características específicas, tales como, por ejemplo aminoácidos que están cargados positivamente, cargados negativamente, hidrófobos, hidrófilos, o aromáticos. Como se la utiliza en la presente, la expresión "aminoácidos de origen natural" se refiere a los isómeros L de los aminoácidos que normalmente se encuentran en las proteínas. Los aminoácidos de origen natural predominantes son glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, metionina, treonina, fenilalanina, tirosina, triptófano, cisteína, prolina, histidina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, arginina, y lisina. A menos que se indique específicamente, todos los aminoácidos a los que se hace referencia en la presente se hallan en la forma-L. Además, tal como se la usa en la presente, la expresión "aminoácidos no naturales" se refiere a aminoácidos que no se encuentran naturalmente en las proteínas. Por ejemplo, selenometionina.

Los aminoácidos que están "cargados positivamente" incluyen cualquier aminoácido que tenga una cadena lateral cargada positivamente bajo condiciones fisiológicas normales. Los ejemplos de aminoácidos de presentación natural cargados positivamente incluyen por ejemplo arginina, lisina, e histidina. A la inversa, los aminoácidos "cargados negativamente" incluyen cualquier aminoácido que tenga cadenas laterales cargadas negativamente bajo condiciones fisiológicas normales. Los ejemplos de aminoácidos de carga negativa aminoácidos que se presentan en la naturaleza incluyen por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico.

Tal como se lo utiliza en la presente, la expresión "aminoácido hidrófobo" incluye cualquier aminoácido que tenga una cadena lateral no polar, no cargada, que es relativamente insoluble en agua. Los ejemplos de aminoácidos de origen natural hidrófobos incluyen, por ejemplo, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, y metionina. Además, tal como se la utiliza en la presente, la expresión "aminoácido hidrófilo" se refiere a cualquiera de los aminoácidos que tengan una cadena lateral polar sin carga que es relativamente soluble en agua. Los ejemplos de aminoácidos de origen natural hidrófilos incluyen por ejemplo serina, treonina, tirosina, asparagina, glutamina y cisteína.

Finalmente, y tal como se lo utiliza en la presente, el término "aromático" se refiere a los residuos de aminoácidos cuyas cadenas laterales tienen un sistema conjugado deslocalizado. Los ejemplos de residuos aromáticos incluyen por ejemplo fenilalanina, triptófano, y tirosina.

Con respecto a la producción de pequeñas moléculas orgánicas no peptídicas que actúan como un ligando en la presente invención, estas moléculas pueden ser sintetizadas usando procedimientos de química orgánica estándar bien conocidos y bien documentados en la patente y en otra bibliografía.

5 Muchos de los métodos conocidos útiles en la síntesis de moléculas líder de la presente invención pueden ser automatizados, o de alguna otra manera pueden ser implementados en una escala comercial. Como tal, una vez que una molécula líder ha sido identificada provista de un potencial comercial, es fácil producir cantidades masivas de dicha molécula.

4. Caracterización de moléculas

10 Las moléculas diseñadas, seleccionadas y/o optimizadas mediante métodos descritos anteriormente, una vez producidas, se pueden caracterizar usando una variedad de ensayos conocidos por los expertos en la técnica para determinar si los compuestos tienen actividad biológica. Por ejemplo, las moléculas se pueden caracterizar mediante ensayos convencionales, inclusive pero sin limitación, los ensayos descritos en lo que sigue, para determinar si tienen una actividad predicha, una actividad de unión y/o una especificidad de unión.

15 Además, puede utilizarse una selección sistemática de elevado rendimiento para acelerar el análisis usando dichos ensayos. Como resultado, puede ser posible seleccionar sistemáticamente de manera rápida nuevas moléculas en base a su capacidad de interactuar con un ribosoma o subunidad ribosómica mediante las herramientas y métodos de la presente invención. Se describen metodologías generales para la realización de la selección sistemática de elevado rendimiento en por ejemplo Devlin (1998) High Throughput Screening, Marcel Dekker; y en la patente de los EE. UU. N.º 5.763.263. Los ensayos de alto rendimiento pueden utilizar una o más técnicas de ensayo diferentes, inclusive sin limitación, los que se describen a continuación.

(1) Estudios de unión de superficie. Una variedad de ensayos de unión puede ser útil en la detección de nuevas moléculas en cuanto a su actividad de unión. Un enfoque incluye la SPR (surface plasmon resonante, resonancia de plasmón superficial) que se puede utilizar para evaluar las propiedades de unión a moléculas de interés con respecto a un ribosoma, subunidad ribosómica o un fragmento de los mismos. Las metodologías de SPR miden la interacción entre dos o más macromoléculas en-tiempo real por intermedio de la generación de un plasmón superficial de la mecánica cuántica. Un dispositivo, (el BIAcore Biosensor RTM de Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ) provee un haz enfocado de luz policromática a la interfaz entre una película de oro (provista en forma de un "chip" biosensor desechable) y un compartimiento intermedio que puede ser regulado por el usuario. Un "hidrogel" de 100 nm de espesor compuesto por dextrano carboxilado que provee una matriz para la inmovilización covalente de los analitos de interés, está fijado a la película de oro. Cuando la luz enfocada interactúa con la nube de electrones libres de la película de oro, se refuerza la resonancia de plasmón. La luz reflejada resultante se agota espectralmente en longitudes de onda que se desarrollaron de manera óptima en resonancia. Mediante la separación de la luz policromática reflejada en sus longitudes de onda componentes (mediante un prisma), y la determinación de las frecuencias que se agotan, el BIAcore establece una interfaz óptica que informa con precisión acerca del comportamiento de la resonancia de plasmón de superficie generada. Si se diseña como anteriormente descrito la resonancia de plasmón (y por lo tanto el espectro de agotamiento) es sensible a la masa en el campo evanescente (que corresponde aproximadamente al espesor del hidrogel). Si uno de los componente de un par interactuante se inmoviliza en el hidrogel, y se provee el compañero de interacción a través del compartimiento intermedio, la interacción entre los dos componentes puede medirse en tiempo real basado en la acumulación de masa en el campo evanescente y en sus efectos correspondientes de la resonancia de plasmón medido por el espectro de agotamiento. Este sistema permite la medición rápida y sensible en tiempo real de las interacciones moleculares y sin la necesidad de etiquetar alguno de los componentes.

(2) *Inmunodiagnósticos e inmunoensayos.* Se trata de un grupo de técnicas que se pueden utilizar para la medición de sustancias bioquímicas específicas, comúnmente a bajas concentraciones en mezclas complejas tales como fluidos biológicos, que dependen de la especificidad y de la elevada afinidad mostrada por anticuerpos adecuadamente preparados y seleccionados en cuanto a sus antígenos complementarios. Una sustancia a medir debe ser necesariamente antigénica - ya sea una macromolécula inmunogénica sea una pequeña molécula hapténica. Para cada muestra se añade una cantidad limitada, conocida, de anticuerpo específico y se estima la fracción del antígeno que se combina con ella, frecuentemente expresada como relación entre unido y libre, para lo cual se utiliza como indicador una forma del antígeno marcado con radioisótopo (radioinmunoensayo), molécula fluorescente (fluoroinmunoensayo), radical libre estable I (inmunoensayo de spin), enzima (inmunoensayo enzimático), o otra etiqueta fácilmente distinguible.

Los anticuerpos pueden ser etiquetados de diversas maneras, inclusive: ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay); radioinmunoensayo (RIA, radioimmuno assay); inmunoensayo fluorescente (FIA, fluorescent immunoassay); inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA, chemiluminescent immunoassay), y etiquetando el anticuerpo con partículas de oro coloidal (inmunooro).

Los formatos de ensayo comunes incluyen el ensayo en sándwich, el ensayo de competencia o competitivo, el ensayo de aglutinación de látex, el ensayo homogéneo, el formato de placa de microtitulación y el ensayo basado en micropartículas.

(3) *Ensayo inmunosorbente ligado a enzima* (ELISA). ELISA es una técnica inmunoquímica que evita los riesgos de los productos radioquímicos y el costo de los sistemas de detección por fluorescencia. En cambio, el ensayo utiliza enzimas como indicadores. ELISA es una forma de inmunoensayo cualitativo basado en el uso de anticuerpos (o de antígenos) que están unidos a la superficie de un vehículo insoluble, que seguidamente se utiliza para “capturar” el antígeno (o anticuerpo) relevante en la solución del ensayo. Seguidamente se detecta el complejo antígeno – anticuerpo mediante la medición de la actividad de una enzima adecuada que ha estado anteriormente fijada de manera covalente al antígeno (anticuerpo).

Se describen métodos generales y composiciones en por ejemplo Crowther (1995) *ELISA - Theory and Practice* (Methods in Molecular Biology), humana Press; Challacombe and Kemeny, (1998) *ELISA and Other Solid Phase Immunoassays - Theoretical and Practical Aspects*, John Wiley; Kemeny, (1991) *A Practical Guide to ELISA*, Pergamon Press; Ishikawa, (1991) *Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay* (Laboratory Techniques en Biochemistry and Molecular Biology) Elsevier.

(4) *Ensayos colorimétricos*. La colorimetría es cualquier método de análisis químico cuantitativo en el que la cantidad o cantidad de un compuesto se determina comparando el color producido por la reacción de un reactivo con cantidades tanto estándar como de ensayo del compuesto, utilizándose frecuentemente un colorímetro. Un colorímetro es un dispositivo para medir la intensidad de color o las diferencias de intensidad de color, sea visualmente sea fotoeléctricamente. Los ensayos colorimétricos estándar para establecer la actividad enzimática de beta-galactosidasa son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Norton et al (1985) *Mol Cell Biol.* 5: 281-290). Un ensayo colorimétrico puede llevarse a cabo en lisados de células enteras usando O-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido (ONPG, Sigma) como sustrato en un ensayo de beta-galactosidasa colorimétrico estándar (Sambrook et al (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press). También hay ensayos colorimétricos automatizados disponibles para la detección de la actividad de beta-galactosidasa, como se describe en la patente de EE. UU. N.º 5.733.720.

(5) *Ensayos de inmunofluorescencia*. Los ensayos de inmunofluorescencia de microscopia de inmunofluorescencia son una técnica en la que un antígeno o anticuerpo se hace fluorescente por conjugación con un colorante fluorescente y después se deja reaccionar con el anticuerpo o antígeno complementario en una sección de tejido o frotis. La ubicación del antígeno o anticuerpo se puede determinar seguidamente mediante la observación de la fluorescencia mediante microscopia bajo luz ultravioleta.

Una descripción general de técnicas inmunofluorescentes aparece por ejemplo, en Knapp et al. (1978) *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*, Elsevier; Allan, (1999) *Protein Localization by Fluorescent Microscopy - A Practical Approach* (The Practical Approach Series) Oxford University Press; Caul, (1993) *Immunofluorescence Antigen Detection Techniques en Diagnostic Microbiology*, Cambridge University Press. Para explicaciones detalladas de técnicas inmunofluorescentes aplicables a la presente invención, ver por ejemplo la patente de los EE. UU. N.º 5.912.176; patente de los EE. UU. N.º 5.869.264; patente de los EE. UU. N.º 5.866.319; y patente de los EE. UU. N.º 5.861.259.

(6) *Polarización de fluorescencia*. La polarización de fluorescencia (FP, Fluorescence Polarization) es una técnica de medición que se puede aplicar fácilmente a las interacciones proteína-proteína y de proteína-ligando a efectos de derivar los IC_{50} y los K_d de la reacción de asociación entre dos moléculas. En esta técnica una de las moléculas de interés se conjuga con un fluoróforo. Esta es generalmente la molécula más pequeña en el sistema (en este caso, la molécula de interés). La mezcla de la muestra, que contiene tanto el conjugado ligando-sonda como el ribosoma, subunidad ribosómica o fragmento de los mismos, se excita con luz polarizada verticalmente. La luz es absorbida por los fluoróforos de la sonda, y reemitida poco después. Se mide el grado de polarización de la luz emitida. La polarización de la luz emitida depende de varios factores, pero en especial de la viscosidad de la solución y del peso molecular aparente del fluoróforo. Con los controles adecuados, los cambios en el grado de polarización de la luz emitida dependen solamente de cambios en el peso molecular aparente del fluoróforo, que a su vez depende de si el conjugado sonda-ligando está libre en solución, o está unido a un receptor. Los ensayos de unión basados en FP tienen una serie de ventajas importantes, inclusive la medición de IC_{50} y de K_d bajo verdaderas condiciones de equilibrio homogéneos, velocidad de análisis y aptitud para su automatización, y la capacidad de seleccionar sistemáticamente en suspensiones turbias y en soluciones coloreadas.

(7) *Síntesis de proteínas*. Se considera que, además de la caracterización mediante los ensayos bioquímicos recién descritos, la molécula de interés también puede ser caracterizada como un modulador (por ejemplo, un inductor de la síntesis de proteínas o un inhibidor de la síntesis de proteínas) de la actividad funcional del ribosoma o de la subunidad ribosómica.

Los inhibidores de la síntesis de las proteínas puede ser sometida a ensayo a un nivel celular. Por ejemplo, las moléculas de interés pueden ser sometidas a ensayo contra organismos, microorganismos, mediante el cultivo del microorganismo de interés en un medio que sea contiene sea carece de la molécula de interés. La inhibición del crecimiento puede ser una indicación que la molécula puede estar actuando como un inhibidor de la síntesis de las proteínas.

Por otra parte, es posible llevar a cabo ensayos más específicos en cuanto a la inhibición de la síntesis de las proteínas mediante la administración del compuesto a un organismo completo, tejido, órgano, organela, célula, extracto celular o subcelular, o a una preparación de ribosoma purificado y observando sus propiedades farmacológicas e inhibidoras mediante la determinación de por ejemplo su constante de inhibición (IC_{50}) para inhibir la síntesis de las proteínas. La incorporación de 3H leucina o de ^{35}S metionina, o experimentos similares, puede ser llevada a cabo para investigar la actividad de la síntesis de las proteínas.

Un cambio en la cantidad o en la velocidad de la síntesis de las proteínas en la célula en la presencia de una molécula de interés indica que la molécula es un inductor de la síntesis de las proteínas. Una disminución en la velocidad o cantidad de la síntesis de las proteínas indica que la molécula es un inhibidor de la síntesis de las proteínas.

Además, la actividad antibacteriana de los compuestos de la presente invención contra agentes patógenos bacterianos puede demostrarse mediante la capacidad del compuesto de inhibir el crecimiento o desarrollo de cepas definidas de patógenos humanos. Para esta finalidad, es posible ensamblar un panel de cepas bacterianas que incluyan una variedad de especies patógenas objetivo, algunos de los cuales contienen mecanismos de resistencia que han sido caracterizados. La utilización de un panel de organismo de este tipo permite determinar las relaciones entre estructura y actividad no solamente en cuanto a potencia y espectro, sino también con una vista a obviar mecanismos de resistencia. Los ensayos pueden llevarse a cabo en bandejas de microtitulación de acuerdo con metodologías convencionales publicadas por: The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) guidelines (NCCLS. M7-A5-Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Fifth Edition. NCCLS Document M100- S12/M7 (ISBN 1-56238-394-9).

H. Formulación y administración de fármacos

Se considera que una vez identificadas, las moléculas activas de la invención se pueden incorporar en cualquier portador adecuado antes de su uso. Más específicamente, la dosis de la molécula activa, el modo de administración y el uso del portador adecuado dependerá del organismo objetivo y no objetivo de interés.

Se considera que, con respecto a los receptores mamíferos, los compuestos de interés pueden ser administrados por cualquier método convencional conocido y/o utilizado en el arte. Por lo tanto, según sea apropiado, la administración puede ser oral o parenteral, inclusive las vías de administración intravenosa e intraperitoneal. Además, la administración puede ser mediante inyecciones periódicas de un bolo, o se puede hacer más continua por administración intravenosa o intraperitoneal desde un depósito que es externo (por ejemplo, una bolsa intravenosa). En determinadas realizaciones, los compuestos de la invención pueden ser de tipo o calidad para fines terapéuticos. Es decir, determinadas realizaciones cumplen con los estándares de pureza y de control de calidad requeridos para su administración a seres humanos. Las aplicaciones veterinarias también recaen dentro significado previsto en la presente.

Las formulaciones, tanto para uso veterinario como para uso médico humano, de los fármacos de acuerdo con la presente invención típicamente incluyen dichos fármacos en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otro(s) ingrediente(s) terapéutico(s). El o los vehículos deberían ser "aceptables" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de las formulaciones y no perjudiciales para el receptor de los mismos. La intención es que los vehículos farmacéuticamente aceptables, en este sentido, incluyan cualquier y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se considera el uso de los mismos en las composiciones. Los compuestos activos complementarios (identificados o diseñados de acuerdo con la invención y/o conocidos en la técnica) también pueden incorporarse en las composiciones. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia/microbiología. Por lo general, algunas formulaciones se preparan poniendo el fármaco en asociación con un vehículo líquido o con un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, se configura el producto con la formulación deseada.

Una composición farmacéutica de la invención debería ser formulada de manera de ser compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen oral o parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, por inhalación, transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyecciones, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos, agentes antibacterianos tales como bencilparabenos de metilo o de alcohol; agentes antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como hidróxido de sodio o ácido clorhídrico

Las soluciones útiles para administración oral o parenteral se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica, descritos, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Gennaro, A., ed.), Mack Pub., (1990). Las formulaciones para administración parenteral también pueden incluir glicocolato para la administración bucal, metoxisalicilato para la administración rectal, o ácido cítrico para la administración vaginal. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico. Los supositorios para la administración rectal también se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente no irritante tal como manteca de cacao, otros glicéridos, u otras composiciones que son sólidas a temperatura ambiente y líquidas a las temperaturas corporales. Las formulaciones también pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados, y similares. Las formulaciones para administración directa pueden incluir glicerol y otras composiciones de alta viscosidad. Otros portadores parenterales potencialmente útiles para estos fármacos incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas. Las formulaciones para la administración por inhalación pueden contener como excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, éter de polioxietileno-9-laurilo, glicocolato y desoxicolato, o soluciones oleosas para la administración en la forma de gotas nasales, o como un gel para aplicación por vía intranasal. Para la administración rectal también pueden utilizarse enemas de retención.

Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de unidades discretas tales como cápsulas, cápsulas de gelatina, sobres, comprimidos, trociscos, o pastillas para succionar, conteniendo cada una de ellas una cantidad predeterminada del fármaco; en la forma de un polvo o gránulos; en la forma de una suspensión en solución o de un líquido acuoso o de un líquido no acuoso; o en la forma de una emulsión o de una emulsión de aceite en agua-o de agua-en-aceite. El fármaco puede administrarse también en la forma de un bolo, electuario o pasta. Puede prepararse un comprimido por compresión o moldeo del fármaco, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos se pueden preparar comprimiendo, en una máquina adecuada, el fármaco en una forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, agente superficie activa o agente dispersante. Los comprimidos de moldeo pueden prepararse por moldeo, en una máquina adecuada, de una mezcla del fármaco en polvo y el portador adecuado humedecido con un diluyente líquido inerte.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes. Las composiciones orales preparadas usando un vehículo fluido para su uso como un enjuague bucal incluyen el compuesto en el vehículo fluido y se aplican por vía oral y se enjuagan y expectoran o tragan. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o los materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa; un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un agente de deslizamiento tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo, o sabor de naranja.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyecciones incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones de dispersión inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) o tampón fosfato salino (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debería conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y sus mezclas adecuadas. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento requerido de las partículas en el caso de una dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones estériles inyectables pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o con una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Por lo general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de entre los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen el secado al vacío y el secado por congelación que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución estéril del mismo previamente filtrada.

Las formulaciones adecuadas para la administración intraarticular pueden estar en la forma de una preparación acuosa estéril del fármaco que puede estar en forma microcristalina, por ejemplo, en la forma de una suspensión microcristalina acuosa. Las formulaciones liposomales o los sistemas de polímeros biodegradables también pueden usarse para presentar el fármaco para su administración tanto intraarticular como oftálmica.

- 5 Las formulaciones adecuadas para la administración tópica, inclusive el tratamiento de los ojos, incluyen preparaciones semilíquidas o líquidas, tales como linimentos, lociones, geles, aplicaciones, o emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite tales como cremas, ungüentos o pastas, soluciones o suspensiones tales como gotas. Las formulaciones para la administración tópica a la superficie de la piel pueden prepararse dispersando el fármaco con un vehículo dermatológicamente aceptable tal como una loción, crema, pomada o jabón. Son particularmente
10 útiles portadores capaces de formar una capa de película sobre la piel para localizar la aplicación e inhibir su eliminación. Para la administración tópica a superficies de tejidos internos, el agente puede dispersarse en un adhesivo tisular líquido o a otra sustancia conocida para mejorar la adsorción a una superficie de tejido. Por ejemplo, es posible utilizar de manera ventajosa hidroxipropilcelulosa o soluciones de fibrinógeno/trombina. Como alternativa pueden utilizarse soluciones para el recubrimiento de tejidos, tales como formulaciones que contienen pectina.
- 15 Para los tratamientos de inhalación, inhalación de polvo (formulaciones de pulverización o de spray) suministrado con una lata de aerosol, puede utilizarse un nebulizador, o un atomizador. Tales formulaciones pueden estar en la forma de un polvo fino para la administración pulmonar de un dispositivo de inhalación de polvo o de formulaciones dispensadoras de polvo autopropulsadas. En el caso de la solución de autopropulsante y de formulaciones de pulverización, el efecto se puede lograr ya sea eligiendo una válvula que tenga las características de pulverización
20 deseadas (es decir, que tenga la capacidad de producir una pulverización que tenga partículas de un tamaño deseado) o incorporando el ingrediente activo como un polvo en suspensión en forma de partículas de un tamaño controlado. Para la administración por inhalación, los compuestos también se pueden administrar en la forma de una pulverización de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contenga un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.
- 25 La administración sistémica también puede ser mediante medios transmucosales o transdérmicas. Para la administración transmucosal o transdérmica, en la formulación se emplean agentes penetrantes apropiados para la barrera a ser permeada. Tales agentes penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido filisídico. La administración transmucosal se puede lograr mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la
30 administración transdérmica, los compuestos activos típicamente se formulan en forma de pomadas, ungüentos, geles, o cremas como generalmente se conoce en la técnica.

- Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto contra su eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, inclusive implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la
35 preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también son provistos comercialmente por Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales también se pueden utilizar como portadores farmacéuticamente aceptables. Los mismos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de los EE. UU. N.º 4.522.811. También pueden utilizarse microsomas y micropartículas.

- Las composiciones orales o parenterales pueden ser formuladas en forma de dosis unitaria para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada unidad una
45 cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias de la invención están impuestas por, y son directamente función, de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se desea obtener, y de las limitaciones inherentes en la técnica de la formación de los compuestos activos para el tratamiento de individuos.

- Como se señaló anteriormente, los fármacos identificados o diseñados de acuerdo con la invención se pueden formular en forma de composiciones farmacéuticas mediante mezclado con excipientes y vehículos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones se pueden preparar para su administración parenteral, particularmente en forma de soluciones líquidas o suspensiones; para su administración oral, particularmente en forma de comprimidos o cápsulas; o para vía intranasal, particularmente en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles. Cuando se desea la adhesión a la superficie de un tejido, la composición puede incluir el fármaco
50 disperso en una composición de fibrinógeno - trombina u otro bioadhesivo. El fármaco puede ser seguidamente pintado, pulverizado o aplicado de algún otro modo a la superficie del tejido deseado. Como alternativa, los fármacos se pueden formular para su administración parenteral o administración oral a seres humanos u otros mamíferos por ejemplo, en cantidades terapéuticamente eficaces, por ejemplo, cantidades que provean concentraciones apropiadas del fármaco al tejido objetivo durante un tiempo suficiente para inducir el efecto deseado.

5 Cuando el compuesto activo ha de ser utilizado como parte de un procedimiento de trasplante, se lo puede proveer al tejido u órgano vivo a ser trasplantado antes de la remoción de tejido o de órgano del donante. El fármaco se puede proveer al huésped donante. Como alternativa, o a título de ejemplo, una vez extraído del donante, el tejido u órgano vivo puede ser colocado en una solución de conservación que contenga el compuesto activo. En todos los casos, el compuesto activo puede ser administrado directamente al tejido deseado, como por ejemplo mediante inyección en el tejido, o se lo puede proveer de forma sistémica, ya sea por la administración oral o parenteral, para lo cual se utiliza cualquiera de los métodos y formulaciones descritos en la presente y/o conocidos en la técnica.

10 Cuando el fármaco comprende parte de una solución para la preservación de un órgano o tejido, puede utilizarse de manera ventajosa cualquier solución de conservación comercialmente disponible. Por ejemplo, las soluciones conocidas en la técnica incluyen la solución de Collins, la solución de Wisconsin, la solución Belzer, la solución de Eurocollins y solución de Ringer lactada.

15 La concentración efectiva de los compuestos para ser entregados en una composición terapéutica variará en función de una serie de factores, inclusive la dosificación final deseada del compuesto a administrar y la vía de administración. También es probable que la dosificación preferida a administrar dependa de variables tales como el tipo y extensión de la enfermedad o indicación a tratar, el estado de salud general del paciente particular, la eficacia biológica relativa del compuesto entregado, la formulación del fármaco, la presencia y tipos de excipientes en la formulación, y la vía de administración. En términos generales, los fármacos de esta invención pueden proveerse a un individuo para lo cual se utilizan dosis unitarias típicas deducidas de los estudios descritos anteriormente efectuados en mamíferos tales como primates no humanos y roedores.

20 Cuando los compuestos activos son moléculas de ácido nucleico, el ácido nucleico puede insertarse en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica pueden administrarse a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase, la patente de los EE. UU. N° 5.328.470) o mediante inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91:3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que está insertado el vehículo para la administración del gen. Como alternativa, cuando el vector de suministro del gen completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de suministro de genes.

30 Cuando un compuesto activo de la invención está destinado a la administración a un huésped planta, la invención se puede aplicar directamente al entorno de la planta, por ejemplo, a la superficie de las hojas, brotes, raíces o partes florales. Como alternativa, la presente invención se puede utilizar como un recubrimiento de semillas. La determinación de una cantidad efectiva de la presente invención requerida para una planta en planta se halla dentro de la experiencia de la técnica y dependerá de factores tales como las especies de plantas, el método de la plantación, y el tipo de suelo. Se considera que las composiciones que contienen fármacos de la invención se pueden preparar mediante la formulación de tales fármacos con adyuvantes, diluyentes, vehículos, etc., de manera de proveer composiciones en la forma de limaduras/sólidos en forma partículas divididas, gránulos, pastillas, polvos humectables, polvo, suspensiones o dispersiones acuosas, y emulsiones. Se considera además utilizar tales fármacos en forma encapsulada, por ejemplo, los fármacos pueden ser encapsuladas dentro de polímeros, gelatina, lípidos u otros auxiliares de formulación tales como emulsionantes, surfactantes, agentes antiespumantes y agentes anticongelantes, y agentes humectantes que pueden ser incorporados en tales composiciones, especialmente si tales composiciones se almacenarán para cualquier período de tiempo antes de su uso. La aplicación de composiciones que contienen fármacos de la invención a título de agente activo puede llevarse a cabo mediante técnicas convencionales. Cuando un compuesto activo está destinada a la administración a un huésped insecto, se consideran métodos estándar tales como sin limitación, la dispersión aérea.

45 El compuesto activo identificado o diseñado mediante un método de la invención también incluye los precursores de los compuestos activos. El término "precursor" se refiere a un derivado farmacológicamente inactivo (o parcialmente inactivo) de una molécula genitora que requiere biotransformación, sea espontánea o enzimática, dentro del organismo para liberar los compuestos activos. Los precursores son variaciones o derivados de los compuestos de la invención que tienen grupos que son desdoblables bajo condiciones metabólicas. Los precursores se convierten en los compuestos activos de la invención que son farmacéuticamente activos in vivo, cuando experimentan solvolisis bajo condiciones fisiológicas o experimentan una degradación enzimática. Las formas precursoras a menudo ofrecen ventajas de solubilidad, compatibilidad con los tejidos, o liberación retardada en el organismo mamífero (véase Bundgard, Design of Prodrugs, pp. 7-9,21-24, Elsevier, Amsterdam (1985); y Silverman, The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action pp. 352-401, Academic Press, San Diego, CA (1992).

55 El compuesto activo identificado o diseñado mediante los métodos descritos en la presente se pueden administrar a individuos para tratar trastornos (profilácticamente o terapéuticamente). En conjunción con dicho tratamiento, la farmacogenómica (es decir, el estudio de la relación entre el genotipo de un individuo y la respuesta de dicho individuo a un compuesto o fármaco extraños) pueden ser tenida en cuenta. Las diferencias en el metabolismo de los agentes terapéuticos pueden conducir a toxicidades graves o a un fracaso terapéutico por el hecho de alterar la relación entre la dosis y la concentración del fármaco farmacológicamente activo en la sangre. Por lo tanto, un médico o clínico puede considerar la aplicación de los conocimientos obtenidos en los estudios farmacogenómicos

relevantes para decidir si se administra un fármaco, así como también la adaptación de la dosis y/o régimen terapéutico del tratamiento con el fármaco.

5 Con respecto a los mamíferos, se considera que la dosis efectiva de un inductor o inhibidor de la síntesis de las proteínas estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, administrados en una sola o en dosis múltiples. Típicamente, el inductor o inhibidor se puede administrar a un receptor humano en necesidad de un tratamiento en un intervalo de dosis diarias de alrededor de aproximadamente 1 a aproximadamente 2000 mg por paciente.

10 A la luz de la precedente exposición general, los ejemplos específicos presentados a continuación son solamente ilustrativos y no tienen por finalidad limitar los alcances de la invención. Otras configuraciones genéricas y específicas serán evidentes para las personas expertas en la técnica.

III. Ejemplos

A. Ejemplo 1: Preparación de cristales de subunidades ribosómicas 50S

15 Se cultivó *H. marismortui* como anteriormente descrito (Ban et al. (1998) supra) en una versión ligeramente modificada del medio de cultivo ATCC 1230, que se complementó con 4,3 g de extracto de levadura, 5,1 g de tris, y 3,4 g de glucosa por litro. Las bacterias se cultivaron a 37 °C hasta un OD_{550nm} entre 1,0 y 2,2. Fueron cosechadas por centrifugación, y se almacenaron a - 80 °C hasta su uso. Las células se disgregaron mediante una prensa French. Los ribosomas se prepararon a partir de lisados por centrifugación, y las subunidades fueron aisladas en gradientes de sacarosa como anteriormente descrito (Shevack et al (1985) FEBS Lett 184: 68-71).

20 Los cristales fueron preparados y estabilizados como sigue:

1. Extracción inversa

(1) Mezclar 1 mg de subunidades en un preparado de subunidad ribosómica 50S (30 mg/ml en 1,2 M KCl, 0,5 M NH₄Cl, MgCl₂ 20 mM, TRis 10 mM, CdCl₂ 1 mM, Tris 5 mM, pH 7,5) con 1/2 volumen de PEG 6000 al 30% (300 g de PEG, 700 ml de H₂O para preparar 1 litro de PEG al 30%; filtrar a través de un filtro de 0,2 mm). Dejar sobre hielo durante 1 a 2 horas.

(2) someter a centrifugación en un tubo de Eppendorf durante aproximadamente 30 segundos mediante una centrifugadora de escritorio.

(3) Remover el material sobrenadante y añadir 100 ml de tampón RE- (PEG 6000 al 7%, KCl 1,2 M, NH₄Cl 0,5 N, KAc 100 mM, MgCl₂ 30 mM, Tris 10 mM, MES 10 mM (pH 7,5), y CdCl 21 mM).

30 (4) Resuspender las pellas a temperatura ambiente mezclando con una pipeta P200 ajustada en 50 ml. El material resuspendido debería parecer un poco nublado.

(5) Envolver el tubo Eppendorf en lámina de aluminio y dejar para su equilibrado a temperatura ambiente durante 30 - 60 minutos. La solución se saturará con subunidades ribosómicas 50S.

35 (6) Centrifugar el precipitado durante 2 minutos en una centrifugadora de mesa a temperatura ambiente, y transferir el material sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf. Debería encontrarse una pequeña pella en el tubo utilizado para la centrifugación. Guardar el material sobrenadante a temperatura ambiente,

(7) Colocar 8- 10 ml de material sobrenadante en la cavidad de muestra de una bandeja de caída sedente (Charles-Cena). Untar material de siembra una hora más tarde tomado de una reserva de material de siembra. La reserva de material de siembra se prepara colocando cristales previamente cultivados en la solución de tampón de estabilización A (véase más abajo), y luego sometiéndolos a un vórtice enérgico. Para untar el material de siembra, se hace pasar un cabello humano limpiado con agua y etanol y seguidamente secado, a través de la solución que ha sido sometida a vértice, y seguidamente se toca en la nueva caída de cristalización. Las gotas deben tener un aspecto turbio. Los depósitos en las bandejas de caída sedentes contienen 1.000 ml de una solución que contiene PEG 6000 al 8%, KCl 1,2 M, NH₄Cl 0,5 M, KAc 100 mM, HAc 6,5 mM (resultado: pH 5,8), MgCl₂ 30 mM, CdCl₂ 1 mM.

45 (8) Después de un día, vea si la siembra tuvo éxito y, de ser así, dejar que los cristales crezcan durante tres semanas.

2. Protocolo de estabilización

50 Cuando los cristales hayan terminado de crecer (después de aproximadamente 3 semanas), abrir cada cámara de caída sedente haciendo solamente un solo corte (hendidura) desde el centro hasta el borde de la cavidad. A través de esta hendidura estrecha, añadir a cada gota en cada depósito 10 ml de tampón A (KCl 1,2 M, BH₄Cl 0,5 M, MgCl₂

30 mM, PEG 6000 al 10%, CdCl₂ 1 mM, KAc 100 mM, Tris 10 mM (titulado a un pH final de 6,1), MES 30 mM) a temperatura ambiente y 45 µl de tampón C (MES 0,667 M, Tris 0,333 M).

Colocar las bandejas en una caja de material plástico con tapa, y colocar en una incubadora a 16 C durante aproximadamente un día, y luego reducir la temperatura de la incubadora a 12 °C durante un día más. A continuación, colocar la caja de material plástico en un contenedor de poliestireno con una tapa, y colocarla en un cuarto frío durante otro día. Los cristales pueden ser almacenados de esta manera durante mucho tiempo, pero deben ser objeto de un cambio de tampón más antes de su uso

Llevar a cabo la siguiente serie de transición utilizando tampón A (véase más arriba) y tampón B (NaCl 1,7 M, NH₄Cl 0,5 M, MgCl₂ 30 mM, CdCl₂ 1 mM, PEG 6000 al 12%, EG al 20%, KAC 100 mM (titulado a pH final 5,8 con HAC) de manera de obtener relaciones finales entre tampón B y tampón A de: 1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 3/4 Todas las soluciones deben mantenerse a temperatura ambiente fría. Todas las manipulaciones siguientes de las gotas se llevarán a cabo a través de la hendidura estrecha:

(1) añadir 40 µl de "1/16" a la gota, y dejar durante 15 minutos.

(2) Añadir 40 µl de "1/8" a la gota, y dejar durante 30-60 minutos.

(3) Extraer 40 µl de la gota (y descartarlo en el depósito), añadir 40 µl de "1/4", y dejar durante 30-60 minutos.

(4) Extraer 40 µl de la gota (y desecharlo en el depósito), añadir 40 µl de "1/2", y dejar durante 15 minutos.

(5) Extraer 40 µl de la gota (y descartarlo en el depósito), añadir 40 µl de "3/4", y dejar durante 15 minutos.

(6) Extraer 40 µl de la gota (y descartarlo en el depósito), añadir 40 µl de tampón B, y dejar durante 15 minutos.

(7) Extraer 60-80 µl de la gota (y descartarlo en el depósito), añadir 60-80 µl de tampón B, y reemplazar los depósitos con 500 µl de tampón B.

B. Ejemplo 2: Determinación de la estructura cristalina de la unidad ribosómica 50S, con el refinamiento inicial

Todos los datos, excepto los dos conjuntos de datos nativos, se obtuvieron en el National Synchrotron Light Source (Brookhaven) a partir de cristales congelados a 100 K, mediante el uso de líneas de haces X12b y X25 y registrados mediante una placa de imagen MAR de 345 mm. Para cada derivado de átomo pesado, se recolectaron datos de difracción anómalos en la longitud de onda correspondiente a la dispersión anómala pico. El tamaño del haz era de 100 x 100 mm para la mayoría de las colecciones de datos en X25 y 200 x 200 mm en la línea de luz X12b. Los cristales se alinearon a lo largo del eje largo de la unidad de celda (570 Å) de modo que pudieron utilizarse oscilaciones de 1,0° para recopilar reflexiones hasta un máximo de 2,7 Å de resolución en el borde del detector MAR. En el haz de luz X12b las distancias de cristal a detector variaron entre 450,0 mm y 550,0 mm en función de la longitud de onda, calidad de cristal, y divergencia del haz, y se eligió de manera tal que los datos de máxima resolución pudieron ser recogidos evitándose al mismo tiempo la superposición de puntos. En el haz de luz X25 el detector se posicionó en una plataforma rígida a 480 mm lo que permitió la recolección de datos a 3,2 Å para derivados de iridio y osmio con la longitud de onda establecida en el borde anómalo. Se recopilaron los datos nativos a una resolución de 2,4 Angstrom en la línea de haz de biología estructural ID19 del Advanced Photon Source (Argonne), para lo cual se utilizó un detector CCD. Los conjuntos de datos se procesaron utilizando DENZO y SCALEPACK (Otwinowski, (1993) Data Collection and Processing).

El faseado basado en átomos pesados se amplió a una resolución de 3,2 Angstrom para lo cual se combinaron fases MIR calculados para dos grupos isomorfos diferentes de datos (MIR1 y MIR2, Tabla 1) con fases SAD (single derivative anomalous dispersión, de dispersión anómalos derivado simples). Los dos derivados mejores fueron pentamina de osmio y hexamina de iridio, cada uno de los cuales contenía un gran número de sitios de unión (Tabla 1). Varios otros derivados con un menor número de sitios mejoraron aún más la calidad del mapa. Todo el faseado se realizó mediante el método de máxima probabilidad implementado en CNS (Brünger et al (1998) supra.) con la excepción de la derivada Ta₆Br₁₂, que fue refinado en SHARP (de La Fortelle, (1997) Meth. Enzymol. 276: 472 - 494) representado como densidad esféricamente promediada de electrones (Tabla 1). Las fases se mejoraron y ampliaron de 3,3 Å a 2,4 Å mediante flípeo con solventes (Abrahams et al. (1996) supra), y se construyeron modelos a partir del conjunto de datos.

C. Ejemplo 3: Preparación de cristales de complejo subunidad ribosómica 50S/Puromicina y recopilación de datos de difracción de rayos X

Se cultivaron cristales de subunidades ribosómicas 50S y se los estabilizó como se describió anteriormente. La CCdA- p-puromicina (véase la Figura 9A) fue un generoso regalo de Michael Yarus (Welch et al. (1995) supra). Los oligonucleótidos de minihélices amino-N-acilados (ver la Figura 9B) fueron sintetizados por Dharmacon. Después de la desprotección, los oligonucleótidos se calentaron brevemente a 100 °C y se enfriaron rápidamente sobre hielo para reemplado. Los cristales de subunidades ribosómicas 50S fueron estabilizados y luego dejados en remojo durante 24 horas en tampón de estabilización más CCdA- p-puromicina 100 mM o minihélices de amino-N-acilado

antes de criovitrificación en propano líquido y recolección de datos de difracción de rayos- X. Las fases se calcularon mediante modificación de densidad (CNS) empezando con las mejores fases experimentales y utilizando 2Fo (analógica)-Fo (nativo) para las amplitudes, de 60,0 a 3,2 Å. (Las amplitudes nativas eran del conjunto de datos nativo 1 más isomorfo, con excepción de aquellas amplitudes que estaban presentes sólo en el conjunto de datos nativos 2 más completo. Las amplitudes calculadas 2Fo-Fo que eran de menos de dos veces el correspondiente calculado y fueron reemplazados por Fo (analógico)). Seguidamente se calcularon los mapas mediante fases de densidad modificados y amplitudes 2Fo (analógica)-Fo (nativo).

D. Ejemplo 4: Sitios de unión a antibiótico situados en el túnel de salida de polipéptido cerca del centro de peptidiltransferasa

Los mapas de densidad de electrones derivados de complejos cristalinos de la gran subunidad de *H. marismortui* formaron complejos con los tres antibióticos tilosina, carbomicina A y anisomicina con una resolución de aproximadamente 3,0 Å. Todos estos antibióticos se unen a los ribosomas en la región que se encuentra entre el centro de peptidiltransferasa tal como se define por el inhibidor de Yarus, CCdA-puromicina y las puntas de las proteínas L22 y L4 en el punto que forman un pequeño orificio en la salida del túnel de salida de polipéptido. La ubicación general de este importante sitio de unión a los antibióticos se muestra en la Figura 19. La tilosina y carbomicina A parecen funcionar mediante el bloqueo de la salida de polipéptidos recientemente sintetizados. La anisomicina parece bloquear el sitio An.

La gran mayoría de las interacciones entre estos antibióticos y el ribosoma son a través del ARNr que define el sitio An, y la superficie del túnel entre el centro de peptidiltransferasa y la proteína L22. Dado que estos antibióticos no se unen de forma idéntica, habrá muchas maneras adicionales en que los compuestos de moléculas pequeñas pueden ser diseñados para que se unan en esta región, mediante el uso de las herramientas y metodologías de la presente invención. Por ejemplo, mediante la conexión entre sí de los componentes de cada uno de los diferentes antibióticos que se unen a sitios no solapantes, será posible crear nuevos antibióticos híbridos (ver Ejemplo 6). Además, sobre la base de nuevos principios de la interacción de ARN de moléculas pequeñas mostrados por estos complejos de antibióticos es posible diseñar nuevas moléculas totalmente novedosas que se unen a los mismos sitios en el ribosoma, así como también otros ARN apuntados potenciales.

E. Ejemplo 5: diseño y ensayo de antibióticos híbridos

Muchos antibióticos que apuntan a ribosomas, más particularmente a grandes subunidades ribosómicas, y que destruyen la síntesis de proteínas son moléculas complejas que son efectivamente concatenaciones de subestructuras más simples, de las cuales por lo menos interactúa con una parte discreta del ribosoma. Cuando el compuesto en cuestión incluye varias subestructuras interactivas, su sitio de unión es efectivamente la suma de los subsitios que entran en contacto y se acoplan con, cada una de dichas subestructuras. Se ha encontrado que muchos de los antibióticos que apuntan a la gran subunidad ribosómica se unen a la subunidad ribosómica en sitios que están cerca el uno del otro. Por lo tanto existe la posibilidad de sintetizar nuevos antibióticos en lo que una parte que se liga a ribosoma, de un primer antibiótico conocido, está ligado químicamente a una parte que se une al ribosoma, de un segundo antibiótico conocido que interactúa con un subsitio adyacente. El nuevo compuesto que resulta es por lo tanto una quimera o un híbrido de los dos antibióticos a partir de los cuales se deriva.

Los antibióticos quiméricos pueden ser diseñados utilizando la información acerca de las estructuras de los complejos antibiótico/ribosoma analizados anteriormente en la presente. Estas estructuras permiten la identificación de los subsitios de unión de los antibióticos en el ribosoma, y la especificación de las entidades químicas que interactúan con ellos. Equipados con este conocimiento, los expertos en la técnica de la síntesis orgánica pueden sintetizar compuestos que enlazan las subestructuras de interés entre sí en formas que les permitirán interactuar con sus respectivos subsitios al mismo tiempo. Es probable que cualquier compuesto así concebido que funcione de la manera prevista y de la manera indicada inhiba el crecimiento celular y si lo hace, la síntesis de las proteínas *in vivo*. Por lo menos, debería bloquear la síntesis de las proteínas en los sistemas de ensayo *in vitro*. Puede obtenerse más información acerca de las interacciones ribosómicas de un compuesto de este tipo mediante la determinación de la estructura del complejo que forma con el ribosoma, gracias a los métodos descritos en el capítulo D anterior en la presente.

Por ejemplo, como resultado del trabajo descrito en la presente, se ha descubierto que la parte disacárido de la carbomicina se une a la gran subunidad ribosómica en un sitio en estrecha proximidad con el sitio de unión de una porción de la anisomicina. Gracias al uso de esta información y a los paquetes de software descritos anteriormente, el experto puede diseñar un antibiótico híbrido que comprende las porciones de unión a ribosoma pertinentes de carbomicina y anisomicina unidas por intermedio de un ligador químico adecuado.

La Figura 34 muestra el diseño de antibióticos híbridos dados a título de ejemplo. En esta Figura, una porción del antibiótico esparsomicina está unida a una porción del antibiótico cloranfenicol de manera de producir un antibiótico híbrido esparsocloranfenicol. En un primer antibiótico híbrido esparsocloranfenicol, híbrido A, $n = 1$ en la región de unión (1). En un segundo antibiótico híbrido esparsocloranfenicol, híbrido B, $n = 2$ en la región de unión (2). La porción de la molécula de cloranfenicol fue elegido como resultado de los estudios estructurales descritos en

Schlünzen et al. (2001) *Naturaleza* 413: 814-821. Nuevamente, el antibiótico híbrido fue diseñado para permitir que cada componente del antibiótico híbrido se una a su respectivo sitio de unión en la gran subunidad ribosómica.

La Figura 35 muestra el diseño de otro antibiótico híbrido dado a título de ejemplo. En esta figura, una porción del antibiótico esparsoamicina está unida a una porción del antibiótico anisomicina de manera de producir un antibiótico híbrido esparsoanisomicina. Las porciones de cada antibiótico fueron elegidas como resultado de los estudios estructurales de la presente que mostraron cómo cada uno de los antibióticos se une a la gran subunidad ribosómica. El antibiótico híbrido fue diseñado para permitir que cada componente del antibiótico híbrido se una simultáneamente su respectivo sitio de unión en la gran subunidad ribosómica.

Estas moléculas híbridas, una vez diseñadas, pueden ser sintetizadas y purificadas por medio de procedimientos de química orgánica convencionales y esquemas de purificación convencionales. Una vez sintetizada y purificada, la molécula híbrida de interés puede ser seleccionada sistemáticamente para establecer su bioactividad y determinar, por ejemplo, el valor de la IC₅₀ para cada molécula de interés. Estas selecciones sistemáticas pueden incluir, por ejemplo, el cultivo de microorganismos sobre o dentro de medios de cultivo, está complementado con la molécula híbrida o carentes de ella. Cualquier reducción en el número de microorganismos o en la magnitud de las colonias en la presencia de la molécula híbrida sería indicativa de su bioactividad. Además, la molécula híbrida podría ser sometida a ensayo en un ensayo de acoplado de transcripción/traducción libre de células o en un sistema de traducción en la presencia de uno o más aminoácidos etiquetados o usando un sistema indicador no radiactivo. Cualquier reducción en el nivel de los aminoácidos etiquetados incorporados en proteínas en sistemas libres de células que incluyan la molécula híbrida en relación con respecto a sistemas libres de células que carecen de la molécula híbrida, sería indicativa de que la molécula híbrida actúa como un inhibidor funcional de la síntesis de las proteínas. Se considera que la molécula híbrida podría entonces ser refinada de manera iterativa como se expuso en lo que precede en la presente para mejorar su bioactividad y biodisponibilidad.

F. Ejemplo 6: Síntesis de híbridos esparsocloranfenicol

La síntesis de los híbridos esparsocloranfenicol (1 y 2) se muestra en las Figuras 36 a 39, y se describe en etapas como sigue.

i. Síntesis de ácido 6

El ácido 6 en Figura 36 se obtuvo mediante los procedimientos descritos en Ottenheijm et al., *J. Org. Chem.* 1981, 46, 3273-3283, empezándose con el compuesto 4 y pasando por el compuesto intermedio aldehído 5.

5. ii. Síntesis de amina 7

La amina 7 en la Figura 36 se sintetizó como se muestra en la Figura 37. Unas cantidades de L-cisteína (1,00 g, 5,41 mmoles), de cloruro de dimetoxitritilo (DMT) (2,12 g, 5,95 mmoles), y de trietilamina (1,20 ml, 8,56 mmol) se combinaron en 25 ml de ácido acético acuoso al 80% y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Los solventes se evaporaron al vacío, y el residuo se recolectó en 60 ml de acetato de etilo (EtOAc). La solución se lavó con bicarbonato de sodio acuoso saturado (NaHCO₃) (3 x 50 ml), y salmuera (2 x 50 ml). La capa orgánica se secó con sulfato de sodio (Na₂SO₄), y se evaporó de manera de proveer el tioéter de DMT de L-cisteína 10 (2,13 g, 5,03 mmoles, 93%) con una pureza adecuada para su uso en la siguiente reacción.

El aminoácido protegido 10 (5,41 mmoles) se disolvió en 20 ml de tetrahidrofurano anhidro (THF), y se añadió borhidruro de sodio (0,70 g, 18,2 mmol) de a porciones. Se añadió gota a gota trifluoruro de boro eterato (3,03 ml, 23,9 mmol), y la mezcla se dejó en agitación durante la noche a temperatura ambiente. El exceso de eterato de trifluoruro de boro fue destruido con etanol, y la mezcla se filtró. El filtrado se evaporó, y el residuo fue disuelto en cloroformo (60 ml), y se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (40 ml). La capa acuosa se extrajo con cloroformo (20 ml), y la fase orgánica combinada se lavó con salmuera y secada sobre Na₂SO₄. El solvente se evaporó de manera de proveer amino alcohol amino previsto 11 (1,75 g, 85%) en forma de un sólido blanco de pureza adecuada para su uso en la siguiente etapa.

Se disolvió una cantidad de amino alcohol 11 (1,70 g, 4,15 mmol) en 5 ml de acetonitrilo y 5 ml de cloruro de metileno, y la solución se enfrió a 0 °C. Se añadió cloruro de ter-butildimetilsililo (1 M, 5,00 ml, 5,00 mmol), seguido por 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU) (0,67 ml, 4,40 mmoles), y la mezcla se dejó en agitación durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se desactivó por agitación con NaHCO₃ acuoso saturado durante 20 minutos. Se añadió cloruro de metileno adicional y se separaron las capas. La capa orgánica se lavó con NaHCO₃ agua y después con salmuera. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía sobre gel de sílice mediante metanol al 0,2%/ cloroformo de manera de obtener la amina 7 (0,100 g, 5%), ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,41 (d, J = 2 Hz, 2H), 7,41-7,19 (m, 8H), 6,82-6,79 (m, 4H), 3,79 (s, 6H), 3,44-3,41 (m, 1H), 3,35-3,32 (m, 1H), 2,69-2,67 (m, 1H), 2,36-2,33 (m, 1H), 2, 9-215 (m, 1H), 0,85 (s, 9H), 0,05-0,00 (m, 6H).

iii. Síntesis de la amida 8

La amida 8 en la Figura 36 se sintetizó como sigue. Unas cantidades de ácido 6 (0,044 g, 0,221 mmol), amina 7 (0,070 g, 0,134 mmoles), y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0,030 g, 0,21 mmol) se disolvieron en 2 ml de dimetil formamida (DMF). Se añadió 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0,056 g, 0,272 mmoles), y la mezcla fue sometida a agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla se evaporó y se cromatografió sobre gel de sílice usando 0-4% de metanol/cloroformo de manera de proveer la amida 8 (0,070 gramos, 75%), ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,50-7,15 (m, 12H), 6,80 (d, J = 2 Hz, 4H), 5,91 (d ancho, J = 5 Hz, 1H), 4,20-4,11 (m, 1H), 3,74 (s, 6H), 3,66-3,63 (m, 1H), 3,52 -3,49 (m, 1H), 2,49-2,44 (m, 2H), 2,36 (s, 3H), 0,84 (s, 9H), 0,01 (s, 3H), -0,01 (s, 3H).

iv. Síntesis de tiol 9

El tiol⁹ en la Figura 36 se sintetizó como sigue. Una cantidad de amida 8 (0,060 g, 0,086 mmoles) se disolvió en THF a 0 °C. Se añadió eterato de trifluoruro de boro (0,30 ml, 2,37 mmol) gota a gota, y se continuó la agitación durante 20 minutos. La mezcla de reacción se desactivó con etanol (5 ml, agitación durante 5 min), y los solventes se evaporaron. El residuo se trituró con cloroformo, y los sólidos recogidos por centrifugación se lavaron con cloroformo. Los sólidos se secaron de manera de proveer tiol 9 (0,015 g, 63%), ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,31 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,11 (d, J = 9 Hz, 1H), 3,93-3,90 (m, 1H), 3,59-3,50 (m, 3H), 3,22 a 3,20 (m, 1H), 2,68-2,64 (m, 1H), 2,56-2,53 (m, 1H), 2,23 (s, 3H).

v. Síntesis de bromoacetamida 13

La bromoacetamida¹³ en la Figura 37 se sintetizó como sigue. La base libre de (1R, 2R)- cloranfenicol 12 se convirtió en el derivado bis t-butildimetilsilileter como se describe en Orsini et al., *Organic Preparations and Procedures International* 1989, 21, 505-508. El éter de bis-sililo resultante de (1R, 2R)-cloranfenicol (0,56 g, 1,30 mmol), ácido bromoacético (0,146 g, 1,00 mmol) y HOBt (0,163 g, 1,20 mmol) se disolvieron en 6 ml de THF. Se añadió DCC (0,330 g, 1,6 mmol), y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El precipitado se filtró, y el filtrado se evaporó. El residuo se recogió en 60 ml de EtOAc y se extrajo con NaHCO₃ acuoso al 5% (30 ml) y salmuera (2 x 40 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía sobre sílice usando de 01:07 de EtOAc/hexano a 1:5 de EtOAc/hexano como eluyentes de manera de proveer bromoacetamida 13 (0,480 g, 86 %) en forma de un aceite, ¹H - RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,32 (d, J = 5 Hz, 2H), 7,62 (d, J = 5 Hz, 2H), 7,21 (d ancho, J = 5 Hz, 1H), 5,36 (s, 1H), 4,11 a 4,6 (m, 1H), 4,01-3,85 (m, 4H), 3,75-3,68 (m, 2H), 3,39-3,31 (m, 1H), 1,10 (s, 9H), 1,05 (s, 9H), 0,24 (s, 3H), 0,22 (s, 3H), 0,21 (s, 3H), 0,00 (s, 3H).

vi. Síntesis de sulfuro 14

El sulfuro 14 en la Figura 38 se sintetizó como sigue. Una cantidad de tiol 9 0,090 g, 0,315 mmol) se suspendió en 3 ml de THF/0,5 ml de DMF y DBU (49 ml, 0,315 mmol). Una solución de bromoacetamida 13 (0,16 g, 0,284 mmol) en 2 ml de THF se añadió a 0 °C, y la mezcla se calentó a temperatura ambiente y después se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. La reacción se vertió en salmuera saturada (20 ml) y cloroformo (CHCl₃) (40 ml), y se separaron las capas. La capa orgánica se lavó con salmuera saturada (2 x 20 ml) y se secó sobre Na₂SO₄. Los solventes se evaporaron, y el residuo se cromatografió sobre sílice (columna de pipeta) usando un gradiente de elución de 1:20 metanol/cloroformo a 1:10 metanol/cloroformo para producir sulfuro 14 (0,093 g, 43 %) en forma de un sólido blanco ¹H -RMN (500 MHz, 01:01 cloroformo-d/metanol-d₄ (CDCl₃/CD₃OD)) δ 8,15 (d, J = 6 Hz, 2H), 7,55 (d, J = 5 Hz, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,47 (d, J = 6 Hz, 2H), 7,37 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,14 (d, J = 9 Hz, 1H), 5,20 (s ancho, 1H), 4,09 -4,02 (m, 1H), 3,98-3,92 (m, 1H), 3,70-3,53 (m, 5H), 3,33-3,12 (m, 4H), 2,67-2,61 (m, 2H), 2,31 (s, 3H), 0,91 (s, 9H), 0,90 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), 0,06 (s, 3H), -0,06 (s, 3H), -0,14 (s, 3H).

vii. Síntesis de sulfóxido 16

El sulfóxido 16 en la Figura 38 se sintetizó como sigue. Una cantidad de sulfuro 14 (0,060 g, 0,078 mmol) se disolvió en 2 ml de THF, y la mezcla se enfrió a 0 °C. Se añadió diisopropiletilamina (i-Pr₂NEt) (18 µl, 0,10 mmol), seguido de clorometil metil éter (33,2 ml, 0,39 mmol), y se continuó la agitación durante 1 hora a 0 °C. El baño de enfriamiento se retiró y la reacción se dejó bajo agitación durante 12 horas a temperatura ambiente. La reacción se inactivó con NaHCO₃ acuoso saturado, y se repartió con cloroformo (40 ml). La capa acuosa se extrajo con cloroformo (20 ml), y la fase orgánica combinada se secó sobre Na₂SO₄, y se evaporó. El material en bruto se sometió a cromatografía sobre sílice usando 0-4 % de metanol/cloroformo como eluyente. Se obtuvieron dos fracciones. La fracción 1 (10,8 mg) contenía una impureza menor con un R_f = 0,63 (12 % de metanol/cloroformo) y un componente principal con un R_f = 0,58. La fracción 2 (16 mg) contenía solamente un compuesto con R_f = 0,50. (El alcohol de partida tenía un R_f = 0,36). Estas fracciones parecían contener compuestos que estaban completamente protegidos en el grupo hidroxilo de interés, y parcialmente sobreprotegidos (éteres de MOM éteres en la porción uracilo de las moléculas).

El material de la fracción 2 anterior (0,016 g, 0,020 mmoles) se disolvió en 1 ml de tetracloruro de carbono (CCl₄). A esta solución se añadió una mezcla que contiene titanio (IV) isopropóxido (Ti (Oi-Pr)₄) (0,6 ml, 0,002 mmol), BINAP (0,001 g, 0,004 mmol, agua (0,72 µl, 0,02 mmol) en CCl₄ 1 ml), y la mezcla resultante se agitó a 20 °C (ver Komatsu et al., *J. Org. Chem.* 1993, 58, 4529-4533 para una descripción detallada de este protocolo de oxidación). Se añadió hidropéroxido de ter-butilo en tolueno (1 M, 60 ml, 0,06 mmol) y se continuó la agitación durante 72 horas. En este

momento, el análisis por TLC indicó la conversión de ~ 75 % a un nuevo producto de menor R_f ($R_f = 0,39$, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:1). La reacción se repartió entre NaHCO_3 saturado (10 ml) y CHCl_3 (20 ml). La capa acuosa se lavó con CHCl_3 (2 x 10 ml) y la fase orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 y el disolvente se evaporó. El material en bruto se sometió a cromatografía sobre gel de sílice eluyéndose con 0-5 % de metanol (MeOH) en CHCl_3 . Se obtuvieron dos fracciones: la fracción 1 contenía material de partida sin reaccionar (4,1 mg), mientras que la fracción 2 contenía sulfóxido 16 (7,7 mg, 0,036 mmol).

viii. Síntesis del híbrido esparsocloranfenicol A1

El híbrido esparsocloranfenicol A en la Figura 38 (estructura completa en la Figura 34) fue sintetizado como sigue. Una cantidad de sulfóxido 16 (0,0075 g 0,0091 mmol) fue disuelta en ácido clorhídrico al 0,1 % (HCl) en MeOH (2 mL) y se añadió Dowex ® 50 (forma H^+ (0,2 g). La mezcla fue sometida a agitación a 50 °C durante 3 horas y el análisis por TLC mostró una conversión completa a un producto con un único valor inferior de R_f ($R_f = 0,25$, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 25:3). El Dowex ® 50 fue retirado por filtración y el solvente fue evaporado al vacío.

El producto bruto se disolvió en THF (0,5 ml) y MeOH (0,5 ml), se añadió una solución de H_2SiF_6 (20 peso/vol. en H_2O) (120 ml, 0,15 mmol) y la mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. El análisis por TLC mostró una conversión de aproximadamente el 50% en un producto de línea de base dentro de 3 horas, por lo tanto se continúa la agitación durante la noche (~ 20 horas) durante lo cual se observó casi una formación cuantitativa del producto de línea de base. La reacción se repartió entre CHCl_3 (1 ml) y agua (H_2O) (1,5 ml), las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo una vez con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 (1,5 ml). El análisis por TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 7:1) mostró que el producto de referencia se hallaba exclusivamente en la capa acuosa, mientras que la TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 2:1:0,1) mostró la presencia de compuestos estrechamente relacionados (R_f s 0,71 y 0,67). La capa acuosa se concentró y se cromatografió sobre sílice (columna de pipeta) usándose $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 2:1:0,1 de manera de obtener una mezcla diastereomérica de 1 (0,0017 g, 34%) en forma de un sólido blanco, $^1\text{H-RMN}$, parcial (500 MHz, óxido de deuterio (D_2O)/ CD_3OD) δ 8,15 (d ap, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,57 (d ap, $J = 8,5$ Hz, 2H), 17,42 (d ap, $J = 15,5$ Hz, diastereoisómero mayoritario), 7,39 (app d, $J = 15,5$ Hz, diastereoisómero menor); 1H}, {6,99 (app d, $J = 16$ Hz, diastereoisómero menor), 6,96 (app d, $J = 15,5$ Hz, diastereoisómero principal); 1H}, {2,53 (s, diastereoisómero mayoritario), 2,51 (s, diastereoisómero menor); 3H). HRMS calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{S}$ (M, monodeuterizado) +: Hallado, 555.15.

ix. Síntesis de sulfuro 15

El sulfuro 15 de la Figura 38 se sintetizó como sigue. Una cantidad de sulfuro 14 (0,02 g, 0,026 mmoles) se disolvió en THF (0,3 ml) y MeOH (0,3 ml), se añadió una solución de H_2SiF_6 (20 peso/vol. en H_2O) (200 ml, 0,25 mmol) y la mezcla fue se agitó durante 20 horas a 20 °C. La reacción se repartió entre CHCl_3 (1 ml) y H_2O (0,5 ml), y se separaron las capas. La capa acuosa se concentró y se cromatografió sobre sílice (columna de pipeta) usando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 2.5:1:0.1 de manera de proveer el compuesto 15 (0,0097 g, 70%) como un sólido blanco, $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$) δ 8,21 (d, $J = 9$ Hz, 2H), 7,67 (d, $J = 9$ Hz, 2H), 7,44 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H), 7,15 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H), 5,17 (d, $J = 3$ Hz, 1H), 4,27 (m, 1H), 4,12 (m, 1H), 3,85 (m, 2H), 3,65 (m, 3H), 3.20-3.39 (m, 4H), 2,60 (m, 2H), 2.43 (s, 3H). HRMS calcd para $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_9\text{S}$ (M + H)+: 538,16. Hallado: 538.12

x. Síntesis de bromopropionamida 17

La bromopropionamida 17 de la Figura 39 se preparó con el mismo protocolo descrito para la síntesis de bromoacetamida 13, excepto que se utilizó ácido 3-bromopropiónico en lugar de ácido bromoacético. La bromopropionamida 17 se purificó en columna de gel de sílice usando 01:08 de EtOAc/hexano a EtOAc/hexano 1:4 como eluyentes de manera de proveer bromopropionamida 17 (45%) en forma de una espuma oleosa, $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) (contaminado con ~ 30% de impureza acrilamida) δ 8,18 (d aparato, $J = 9$ Hz, 2H), 7,47 (d ap, $J = 9$, 2H), 5,24 (d ap, $J = 4,5$ Hz, 1H), 4,04 (m, 1H), 3,52-3,67 (m, 4H), 2,69 (m, 2H), 0,95 (s, 9H), 0,92 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), 0,06 (s, 3H), -0,05 (s, 3H), -0,10 (s, 3H).

xi. Síntesis de sulfuro 18

El sulfuro 18 de la Figura 39 se preparó a partir de tior 9 y bromopropionamida 17 utilizando el protocolo descrito para la síntesis del sulfuro 14. El producto resultante se purificó en columna de gel de sílice eluyendo con 10:1 de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ a 08:01 de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ de manera de proveer el sulfuro 18 (7%) en forma de un sólido blanco.

xii. Síntesis de híbrido esparsocloranfenicol B 2

El esparsocloranfenicol híbrido B 2 en la Figura 39 (estructura completa en la Figura 34) se sintetizó como sigue. Una cantidad de sulfuro 18 (0,02 g, 0,026 mmoles) se disolvió en CCl_4 (1,28 ml) que contiene $\text{Ti}(\text{O}i\text{-Pr})_4$ (0,77 ml, 0,0026 mmol), BINAP (0,0015 g, 0,0052 mmol), agua (0,92 ml, 0,026 mmol), y la solución se agitó a 20 °C. Se añadió hidropéroxido de ter-butilo en tolueno (1 M, 71,3 ml, 0,07 mmol) y se continuó agitando a 20 °C durante 72 horas. La reacción se repartió entre NaHCO_3 saturado (10 ml) y CHCl_3 (20 ml). La capa acuosa se lavó con CHCl_3 (2x10 ml), la capa orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 y el disolvente se evaporó. El material en bruto se sometió a cromatografía sobre sílice eluyéndose con MeOH al 0-10% en CHCl_3 . Se obtuvieron dos fracciones: la fracción 1 contenía sulfuro sin reaccionar 18 (0,0055 g) y la fracción 2 contenía el sulfóxido deseado (0,008 g, 38%).

El producto sulfóxido en la fracción 2 anterior (0,008 g 0,01 mmol) se disolvió en THF (0,5 ml) y MeOH (0,5 ml), se añadió una solución de H_2SiF_6 (20 peso/vol. en agua) (120 ml, 0,15 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche (~ 20 horas) durante lo cual se observó una formación casi cuantitativa de un producto de línea de base. La reacción se repartió entre CHCl_3 (1 ml) y H_2O (1,5 ml), se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo una vez con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 (1,5 ml). El análisis por TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 7:1) mostró que el producto de referencia se hallaba exclusivamente en la capa acuosa, mientras que el TLC basado en $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 2:1:0,1 mostró la presencia de compuestos estrechamente asociados (R_{FS} 0,52 y 0,47). La capa acuosa se concentró y se cromatografió sobre sílice (columna de pipeta) usando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 2:1:0,1 resultando una mezcla diastereomérica de 2 (0,0036 g, 69 %) en forma de un sólido blanco), ^1H -RMN, parcial (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$) δ {8,20 (d app, J = 8,8 Hz), 8,13 (d aparato, J = 8,8 Hz); 2H}, {7,58 (d aparato, J = 9 Hz), 7,54 (d ap, J = 9 Hz); 2H}, {7,34 (d app, J = 15 Hz), 7,24 (d ap, J = 15 Hz); 1H}, {7,01 (d app, J = 15 Hz), 7,00 (d app d, J = 15 Hz); 1H}, 2,76 (m, 2H), 2,34 (s ancho, 3H). HRMS calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{S M} + \text{H}$ +: 568,17. Encontrado: 568,14.

Ejemplo 7: síntesis del híbrido esparsoanisomicina

La síntesis del híbrido esparsoanisomicina 3 se muestra en las Figuras 40 y 41, y se describe en etapas como sigue:

15 i. Síntesis de fenol 21

El fenol 21 de la Figura 40 se sintetizó como sigue. Una cantidad de anisomicina 19 (0,5 g 1,88 mmol) se suspendió en 15 ml de acetonitrilo. Una cantidad de 9-fluorenilmetil succinimida (0,762 g 2,26 mmol) se añadió a la suspensión. Después de la adición, todo el sólido se disolvió. Después de agitar durante 16 horas a temperatura ambiente, se añadió agua a la solución de reacción, y se extrajo con acetato de etilo. Los compuestos orgánicos se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio. Después de la filtración y la concentración, la purificación se realizó por cromatografía en columna usando 3:1 de hexanos: acetato de etilo como fase móvil. Esto permitió obtener 9-fluorenilmetilo carbamato 20 en forma de espuma con rendimientos cuantitativos (0,916 g).

El compuesto 20 (0,929 g 1,90 mmol) se disolvió en 1,5 ml de 1-metil-2-pirrolidinona seca. Se añadió imidazol (0,776 g 11,4 mmol) y luego cloruro de ter-butildimetilsililo (0,859 g 5,70 mmol) a la solución. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1,5 horas, la solución de reacción se aplicó directamente a una columna de sílice. La columna se eluyó con una solución de 6:1 de hexanos:acetato de etilo resultando el producto sililado deseado (1,04 g, 91%) en forma de una espuma blanca.

El producto sililado anterior (1,04 g 1,73 mmol) se disolvió en 15 ml de cloruro de metileno seco. La solución se enfrió a -10°C . Se añadió una solución 1,0 M de tribromuro de boro (17,3 ml). Después de 2 horas, se añadieron 4 ml de la solución de tribromuro de boro. Después de 2 horas adicionales a -10°C , la solución de reacción se vertió en una solución acuosa a 0°C saturada de bicarbonato de sodio. La mezcla se agitó vigorosamente durante 30 minutos. A continuación, se separó y se extrajo con cloruro de metileno. Las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio. La purificación se realizó usando cromatografía en columna eluyéndose con 4:1 de hexanos/acetato de etilo y luego 2:1 de hexanos/acetato de etilo después de que el material de partida estaba fuera de la columna de fenol de manera de proveer 21 (0,748 g 74 %) en forma de una espuma blanca, ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7,80 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,74 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,63 (m, 2H), 7,36 (m, 4 H), 7,06 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,79 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,74 (s, 2H), 4,84 (m, 1H), 4,69 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 4,50 (m, 2H), 4,34 (m, 2H), 4,02 (m, 1H), 3,90 (m, 1H), 3,35 (m, 3H), 2,84 (m, 1H), 2,51 (m, 1H), 2,01 (s, 3H), 0,87 y 0,83 (dos s, 9H), 0,06 y -0,01 (dos s, 6H).

ii. Síntesis de éter metiltiometilfenílico 23

El metiltiometilfenil éter 23 de la Figura 40 se preparó como sigue. Una cantidad de fenol 21 (0,748 mg 1,27 mmol) se disolvió en 10 ml de THF y se añadió 0,2 ml de piperidina. Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, se añadió agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio y se filtraron. El filtrado se concentró y se secó en una bomba de vacío durante varias horas. La espuma amarillenta crudo se disolvió en 10 ml de THF seco y se añadió trietilamina (0,35 ml, 2,54 mmol). Después de agitar durante unos pocos minutos, se añadió di-ter-butilcarbonato (1,11 g 5,08 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Se añadió agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo y las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio. La purificación se realizó por cromatografía en columna usando 4:1 de hexanos/acetato de etilo. El compuesto deseado protegido por N-BOC 22 se aisló en forma de una espuma blanca (0,348 g 59 %, dos etapas).

El compuesto 22 protegido por N-BOC (0,202 g 0,434 mmoles) se disolvió en 2,0 ml de THF seco en atmósfera de argón y se enfrió a 0°C . Se añadió hidruro sódico (0,018 g de una dispersión al 60 %, 0,46 mmol) y la reacción continuó bajo agitación a 0°C durante quince minutos. Se añadió yoduro de sodio (0,071 g 0,48 mmol), hexametilfosforamida (0,45 ml, 2,6 mmol), y éter clorometiltiometilico (36 ml, 0,48 mmol), en este orden. Después de agitar durante cinco minutos, se retiró el baño de hielo y la reacción se calentó a temperatura ambiente. Después de agitar durante otros 45 minutos, se añadió agua a la mezcla de reacción y se extrajo con acetato de etilo. Los compuestos orgánicos se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio. La purificación se realizó usando cromatografía en columna eluyéndose con 6:1 de hexanos/acetato de etilo de manera de proveer éter metiltiometilfenílico 23 (0,203 g, 89 %) en forma de un aceite, ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7,07 (m, 2H), 6,86 (d, J =

8,5 Hz, 2H), 5,11 (s, 2H), 4,84 (m, 1H), 4,33 (m, 1H), 3,91 (m, 1H), 3,35 (m, 3H), 2,83 (m, 1H), 2,24 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 1,48 (s, 9H), 0,81 (s, 9H), -0,02 (s, 6H).

iii. Síntesis de éter clorometilfenílico 24

5 El éter clorometilfenílico 24 de la Figura 40 se sintetizó como sigue. Una cantidad de éter metiltiometilfenílico 23 (0,032 g 0,061 mmoles) se disolvió en 1 ml de cloruro de metileno seco que contenía 0,050 g de tamices moleculares de 3 μm y después se enfrió a 0 °C. Se añadió diisopropiletilamina (15 ml, 0,085 mmol) y cloruro de sulfurilo (6,5 ml, 0,079 mmol) a la mezcla de reacción. Seguidamente la mezcla de reacción se agitó durante dos minutos y se añadió ciclohexeno (12 ml, 0,12 mmol). Cinco minutos después de la adición del ciclohexeno, la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante otros veinte minutos. Después, la reacción se desactivó con agua, se extrajo con cloruro de metileno, y se secó sobre sulfato de sodio. La purificación se realizó usando cromatografía en columna eluyéndose con 6:1 de hexanos: acetato de etilo de manera de obtener el éter clorometilfenílico 24 (0,021 g 67 %) en forma de un aceite, ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,26 (m, 2H), 7,00 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 5,87 (s, 2H), 4,84 (m, 1H), 4,35 (m, 1H), 3,92 (m, 1H), 3,33 (m, 3H), 2,85 (m, 1H), 2,06 (s, 3H), 1,48 (s, 9H), 0,81 (s, 9H), -0,01 (s, 6H).

iv. Síntesis de sulfóxido 25

20 El sulfóxido 25 de la Figura 41 se sintetizó como sigue. Una cantidad de tiol 9 (0,022 g 0,078 mmoles) se disolvió en THF (0,5 ml), DMF (0,2 ml) y DBU (10,3 ml, 0,066 mmol). Se añadió una solución en THF (0,5 ml) de una mezcla 3:2 de éter metiltiometilfenílico 23 y éter clorometilfenílico 24 (0,03 gramos 0,023 mmol, basado en 24) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se vertió en salmuera saturada (10 ml) y CHCl₃ (20 ml) y se separaron las dos capas. La capa orgánica se lavó con salmuera saturada y se secó sobre Na₂SO₄. El análisis por TLC (CHCl₃/MeOH 7:1) mostró una eliminación cuantitativa de tiol sin reaccionar 9. El disolvente se evaporó, y el ¹H-RMN del residuo en CD₃OD/CDCl₃ reveló una desaparición completa del pico de metileno clorometilfenoxi a 5,9 ppm.

25 Se disolvió el material bruto anterior en CCl₄ (3,5 ml) que contiene Ti(Oi-Pr)₄ (1,81 ml, 0,006 mmoles), BINAP (0,0035 g 0,012 mmol), agua (2,17 ml, 0,06 mmol) y la solución se agitó a 20 °C. Se añadió hidroperóxido de terbutilo en tolueno (1 M, 200 ml, 0,2 mmol) y se continuó agitando a 20 °C durante 72 horas. La reacción se repartió entre NaHCO₃ saturado (10 ml) y CHCl₃ (20 ml). La capa acuosa se lavó con CHCl₃ (2x10 ml), las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporó el disolvente. El producto bruto se sometió a cromatografía sobre sílice eluyéndose con 0-7% de MeOH en CHCl₃ de manera de obtener el sulfóxido 25 (0,0054 g, 30% en dos etapas) en forma de un sólido de color amarillo-blanco.

v. Síntesis de esparsoanisomicina 3

35 La esparsoanisomicina 3 de la Figura 41 se sintetizó como sigue. Una cantidad de sulfóxido 25 (0,0035 g, 0,0045 mmoles) se disolvió en cloruro de metileno anhidro (CH₂Cl₂) (0,25 ml) a 0 °C. A esta solución se le añadió ácido trifluoroacético (TFA) (0,25 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos durante los cuales se observó un consumo cuantitativo de 25. El solvente se evaporó y se obtuvo un residuo marrón.

40 El residuo marrón anterior se disolvió en THF anhidro (0,4 ml) y piridina (0,2 ml) en un tubo Falcon, y se mantuvo la agitación a 0 °C. Se añadió fluorhidrato de piridina (HF•Pyr) (0,1 ml) a la reacción, la mezcla se calentó a 20 °C y se agitó durante la noche. La reacción se desactivó mediante la adición de bicarbonato de trietilamonio acuoso (1 M, 50 ml) y se cromatografió sobre sílice (columna de pipeta), primero eluyéndose con CHCl₃/MeOH 03:01-02:01, luego con CHCl₃/MeOH/H₂O a 2:1:0,1 y se obtuvo esparsoanisomicina 3 (0,0012 g 47 %) en forma de un sólido blanco, ¹H-RMN, parcial (500 MHz, D₂O/CD₃OD) δ {7,36 (d ap, J = 15,5 Hz), 7,35 (d ap, J = 15,5 Hz); 1H}, 7,25 (d app, J = 8,6 Hz, 2H), {7,10 (app d, J = 8,6 Hz), 7,09 (d aparato, J = 8,6 Hz); 2H}, {7,04 (d aparato, J = 15 Hz), 7,02 (d app, J = 15 Hz); 1H}, {2,36 (s), 2,35 (s); 3H}, {2,18, (s), 2,17 (s); 3H}. HRMS calculado para C₂₅H₃₂N₄O₉S (M + H)⁺: 565,19. Hallado: 565,16.

45 G. Ejemplo 8: ensayos para establecer la actividad inhibidora de traducción

La actividad inhibidora de traducción de los antibióticos híbridos producidos en los Ejemplos 6 y 7 se probaron en extractos de E. coli 30 S y en ensayos de lisato de reticulocitos de conejo, como sigue:

50 Se utilizó para evaluar la inhibición de la traducción un sistema de extracto E. coli D30 para ADN circular (Número de parte de Promega L1010) una variación del protocolo de Boletín Técnico N ° 092 de Promega. 5ml de extracto S30 fueron incubados con 0,4 mg de BestLuc plásmido de ADN, 16 unidades de inhibidor de ribonucleasa (número de parte de Promega: N2115), trifosfatos de nucleótido 1 mM (NTPs), MgCl₂ 10 mM, Tris 40 mM pH 7,5, durante 30 minutos a 37 °C. Después de permitir la transcripción, el antibiótico (en una concentración final de 0,1% de DMSO), 7 ml de premezcla de Promega y aminoácidos en una concentración final de 0,1 mM se añadieron en un volumen final de 20 ml. Las reacciones se incubaron durante 20 minutos a 37 °C y se añadieron 50 ml de reactivo de ensayo de luciferasa (Promega número de parte: E 1483) para detener la reacción. La luminiscencia de la muestra se midió mediante un espectrofotómetro Victor2V (Perkin Elmer).

El sistema de lisado de reticulocitos de conejo (tratada con nucleasa) (Número de parte de Promega L4960) se usó como la fuente de la traducción eucariótica y se siguió el protocolo del Manual Técnico de Promega 232. Por ejemplo, se añadieron 10 ml de lisado a 2 ml de aminoácidos 1 mM y 3 ml de agua. Se añadieron 2 ml de antibiótico en DMSO al 1% seguido por la adición de 0,6 mg de ARNm de luciferasa (Número de parte de Promega L4561) y 16 unidades de inhibidor de ribonucleasa (Número de parte de Promega N2115) en un volumen final de 20 ml. La reacción se incubó a 24,5 °C durante 45 minutos y se añadieron 40 ml de reactivo de ensayo de luciferasa (Promega número de pieza: E1483) para detener la reacción. La luminiscencia de la muestra fue leída mediante un espectrofotómetro Victor2V (Perkin Elmer).

Los datos de IC₅₀ resultantes para cada antibiótico híbrido vs. anisomicina, esparsomicina y cloranfenicol se han resumido en la Tabla 22.

TABLA 22

Compuesto	IC ₅₀ (µM)	
	<i>E. coli</i>	Reticulocitos de conejo
Esparsocloranfenicol híbrido A1	29,9	0,82
Esparsocloranfenicol Híbrido B2	4,1	0,36
Deoxiesparsocloranfenicol 15	14	6,4
Esparsoanisomicina 3	26,7	0,07
Anisomicina	>100	0,19
Esparsomicina	0,21	0,14
Cloranfenicol	12.3	>100

Los datos en la Tabla 22 indican que todos los antibióticos híbridos producidos en los Ejemplos 6 y 7 son capaces de inhibir la traducción en dos ensayos de traducción diferentes. Por otra parte, bajo determinadas condiciones de ensayo, por lo menos uno de los antibióticos híbridos (la Esparsoanisomicina) fue un inhibidor de la síntesis de proteínas más potente que cualquiera de los antibióticos en los que se basó.

H. Ejemplo 9: Unión de antibióticos macrólidos a la gran subunidad ribosómica

Las estructuras cristalinas de la gran subunidad ribosómica de *H. marismortui* formaron complejos con cinco macrólidos, carbomicina A, espiramicina, tilosina, azitromicina, y eritromicina mostraron que estos antibióticos se unen en el túnel de salida de polipéptido inmediatamente adyacente al centro de peptidiltransferasa. La tilosina, carbomicina A y espiramicina son macrólidos de 16 miembros. La azitotromicina es un macrólido de 15 miembros. La eritromicina es un macrólido de 14 miembros.

Sus respectivos lugares de unión y masas sugieren que inhiben la síntesis de proteínas por el hecho de bloquear el paso de polipéptidos nacientes a través del túnel de salida de péptidos. El sacárido en la posición C5 de cada uno de los anillos de lactona se extiende por el túnel de salida hacia el sitio de peptidiltransferasa. La extensión isobutirato de disacárido carbomicina A se superpone al sitio de unión del sustrato A. Un enlace covalente reversible parece formarse entre el sustituyente etilaldehído en el C6 del anillo de lactona y el N6 de A2103 (A2602, *E. coli*) en 23 ARNr.

Los cristales que contienen grandes subunidades ribosómicas de *H. marismortui* con carbomicina A, espiramicina, tilosina, azitromicina, y eritromicina unidos, se obtuvieron añadiendo tampones estabilizantes que contienen estos antibióticos a los cristales preformados, de grandes subunidades ribosómicas. Las estructuras de estos antibióticos complejizados con estos cristales fueron determinadas con una resolución de 3,0 Å (3,5 Å para la eritromicina) a partir de mapas de Fourier de diferencia calculados inicialmente utilizando amplitudes de difracción observados de los cristales nativos y complejos [F_o (complejo)-F_o (nativo)], y seguidamente se refinaron las coordenadas del complejo entero.

Los ribosomas fueron purificados y cristalizados como se ha descrito previamente (Ban et al., (2000). Los antibióticos se seleccionaron para su ensayo sobre la base de su actividad conocida frente a *H. marismortui* (Sanz et al., (1993) Can. J. Microbiol. 39: 311-317) y de su disponibilidad. La carbomicina A fue provista por Pfizer. La tilosina fue comprada a Sigma. Una mezcla de espiramicinas I, II y III, que sólo difieren en el tamaño de la parte unida a C3, también se compró a Sigma. La azitromicina fue generosamente provista por Dale L. Boger, Departamento of Chemistry, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA. La eritromicina fue provista por Sigma.

Unos cristales que contienen grandes subunidades ribosómicas de *H. marismortui* complejizados con carbomicina A, espiramicina, tilosina, azitromicina y eritromicina se obtuvieron por inmersión de cristales de grandes subunidades,

pre-formados, en tampones estabilizantes que contienen los antibióticos. Los antibióticos se solubilizaron en dimetilsulfóxido (DMSO), y a continuación, se añadieron al tampón de estabilización estándar (Ban et al., (2000) supra) hasta una concentración final de 1,0 mM (y final de DMSO de 1 a 4%), y seguidamente se incubaron a 4 °C durante 24 horas antes de la criovitrificación de cristales en propano líquido. Se recopilaron datos de difracción de rayos X iniciales para los antibióticos carbomicina A, espiramicina y tilosina en las líneas de haz X25, X12b o X12c en el Brookhaven National Laboratory. Los datos se han reducido mediante software Denzo o HKL2000 y escalado con SCALEPACK (Otwinowski (1997) Processing of Xray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode," Methods in Enzymology 276(A):307-326). La densidad electrónica correspondiente a estos macrólidos fue vista por primera vez en mapas Fourier de diferencia F_o (antibiótico)- F_o (nativo) con una resolución de 4,0 Å. Se recopilaron datos de mayor resolución en la línea de haces ID 19 en el Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory. El inicio de los modelos de macrólidos y de sus archivos de topología y parámetros se efectuó mediante la conexión y la modificación de los anillos de lactona y azúcares de diversas estructuras afines de pequeñas moléculas. (Woo et al. (1996) Tetrahedron 52(11): 3857-3872; Jones et al. (1982) Journal of Antibiotics 35(4): 420-5; Stephenson et al. (1997) Pharmaceutical Sci., 86: 1239) mediante geometría esteroquímica estándar y software xplo-2d (Kleywegt et al. (1998) Acta Cryst, D54: 1119-1131) y O (Jones et al. (1991) Acta Cryst. A47: 110-119). Para la mezcla de espiramicinas, solamente se utilizó la espiramicina I en la determinación de las estructuras. Los modelos de antibióticos fueron inicialmente adaptados a los mapas de densidad electrónica de diferencia $F_o - F_c$. Las estructuras de los antibióticos complejizados con estos cristales fueron determinadas con una resolución de 3,0 Å con respecto a los mapas de Fourier de diferencia calculados utilizándose inicialmente amplitudes de difracción observadas de los cristales nativos y complejos, [F_o (complejo)- F_o (nativo)], y seguidamente se refinaron las coordenadas del complejo entero. Las estructuras de estos complejos fueron refinadas mediante CNS (Brünger et al. (1998) Acta Cryst. D54: 905-921) para la refinación para cuerpo rígido, minimización de energía, y refinación del factor B de la estructura entera del ribosoma nativo que incluye el antibiótico, y mediante modificaciones manuales de solamente el área inmediata que rodea el antibiótico unido. Se ignoraron las diferencias no isomorfas alejadas con respecto al antibiótico. El proceso de refinación fue repetido de manera iterativa en el modelo que contenía el antibiótico. Las estructuras covalentes de los macrólidos y un cambio conformacional que implica A2103 explicaba los principales rasgos en los mapas de densidad electrónica de diferencia.

Sobre la base de estos estudios el grupo etilaldehído en la posición C6 del anillo de lactona de cada uno de los macrólidos de 16 miembros parece formar un enlace covalente con la N6 de A2103. No sólo el N6 de A2103 y el etilaldehído en C6 de los macrólidos están yuxtapuestos, sino que también están unidos por la densidad electrónica continua, que, con una resolución de 3,0 Å, es indicativo de los enlaces químicos. En contraste, tanto para los macrólidos de 15 miembros como de 14 miembros (ambos carecen de grupos aldehído) no se observó tal densidad continua de electrones. Los únicos modelos para el complejo macrolideribosoma que se ajustan satisfactoriamente a la densidad electrónica observada son aquellos en los que la N6 de A2103 está unida covalentemente al carbono del grupo aldehído del macrólido. Los aldehídos reaccionan reversiblemente con aminas primarias, y si las carbinolaminas resultantes se deshidratan, se producen bases de Schiff. Sin embargo, cuando la amina exocíclica de una base de nucleótidos está implicada, el producto esperado es una carbinolamina, no una base de Schiff (McGhee et al (1977) Biochem 14 (6):1281-1303). Por lo tanto, el modelo que mejor se ajusta a la densidad electrónica fuera de plano en esta región los une a través de un carbinolamina, no por intermedio de una base de Schiff.

Sobre la base de estos estudios, se ha encontrado que la carbomicina A, espiramicina, tilosina, azitromicina, y eritromicina se unen, todas ellas, en la salida del túnel de péptido de la gran subunidad ribosómica, inmediatamente adyacente al centro de peptidiltransferasa. Las cinco estructuras de co-cristal se superpusieron en base solamente de los fosfatos de ARN ribosómico en el fin de comparar objetivamente su unión relativa. Los tres macrólidos de 16 miembros se superponen casi en una base de átomo por átomo. Además, la totalidad de los cinco anillos de lactona ocupan una posición muy similar, comparten una conformación y orientación en común, y forman interacciones similares con el ribosoma. Además, las partes compartidas, tales como la micaminosa de los anillos de 16 miembros (y la correspondiente desosamina de los otros macrólidos) se superponen en casi una base de átomo por átomo. Todas las partes azúcar adoptan las mismas conformaciones extendidas relajadas con respecto al anillo de lactona que se observó en las estructuras de pequeñas moléculas de macrólidos.

Basado en las estructuras resueltas, parece que las interacciones hidrófobas son importantes en la unión de los macrólidos. Una cara de los anillos de lactona de estos antibióticos es bastante hidrófoba, mientras que la cara opuesta es de un carácter más hidrófilo. La totalidad de estos cinco macrólidos se unen al ribosoma con las caras hidrófobas de sus anillos de lactona orientadas hacia la pared del túnel de salida y con las caras hidrófilas de sus anillos de lactona expuestas a la solución. El sitio de unión de la pared del túnel incluye la cara aromática de G2646, que está expuesta debido a que el par de bases C2098-G2646 es de una terminación helical.

Además, estas estructuras arrojan luz sobre el por qué las longitudes de los oligopéptidos sintetizados por los ribosomas macrólidos envenenados varían de la forma en que lo hacen. La longitud de los oligopéptidos sintetizados en la presencia de inhibidores de macrólidos se determina por el grado en el que los sustituyentes en la posición C5 del anillo de lactona penetran en el centro de peptidiltransferasa. La eritromicina y la azitromicina, que tienen sólo un monosacárido en esta posición, deberían permitir la síntesis de péptidos más largos que la tilosina o espiramicina, que tienen un disacárido. Estas observaciones son compatibles con los derivados de estudios bioquímicos que

indican que la eritomicina sí permite la formación de tetrapéptidos, la tilosina y espiramicina permiten la formación de solamente dipéptidos, y la carbomicina A inhibe fuertemente la formación de incluso el primer enlace peptídico.

INCORPORACIÓN A TÍTULO DE REFERENCIA

5 La revelación de cada uno de los documentos patente, artículos científicos, coordenadas atómicas (lo que incluye, sin limitación, aquellos conjuntos registrados en el Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (PDB) con los números de acceso PDB ID: 1FFK; PDB ID: 1FF2; PDB ID: 1FG0; PDB ID: 1JJ2; PDB ID: 1K73; PDB ID: 1KC8; PDB ID: 1K8A; PDB ID: 1KD1; y PDB ID: 1K9M, y/o contenidos en el Disco N.º 1) al que se hizo referencia en la presente, se incorpora en la presente a título de referencia.

10 Por la presente, todos los materiales presentados junto con la presente en un compact disk, Disco N.º 1 se incorporan en la presente a título de referencia. El Disco N.º 1 ha sido creado el 6 de febrero de 2002 y se identifica con un contenido de los siguientes treinta y nueve archivos:

Disco N.º 1:

Archivo:	Magnitud (en bytes)		Páginas
<DIR>		BINDER	
<DIR>		Nos:	
*1JJ2.RTF	12,742,023	2, 3	409
1JJ2.TXT	8,372,780	-	
*ANISOMYCIN.PDB	7,593,128	7 a 13	1617
*azithromycin.pdb	8,088,411	126 a 132	1618
*BLASTICIDIN.PDB	7,594,206	14 a 20	1617
*CARBOMYCIN.PDB	7,592,552	21 a 27	1617
*erythromycin.pdb	7,690,337	133 a 139	1617
FOLDER A <DIR>		-	-
FOLDER B <DIR>		-	-
FOLDER C <DIR>		-	-
*linezolid.pdb	8,086,197	28-34	1617
*PDB1FFK.DOC	7,046,656	4	266
PDB1FFK.ENT	5,484,652	-	-
*PDB1FFZ.DOC 1	1,219,072	5	46
PDB1FFZ.ENT	937,342	--	-
*PDB1FG0.DOC	1,255,728	6	46
PDB1FG0.ENT	942.344	-	-
*SPARSOMYCIN.PDB	7,541,230	35-41	1606
*SPIRAMYCIN.PDB	7,592,549	42-48	1617
*TYLOSIN.PDB	7,595,512	49-55	1617
*VIRGINIAMYCIN.PDB	7,591,745	56-62 1	617
FOLDERA:			
<DIR>			

ES 2 448 815 T3

Archivo:	Magnitud (en bytes)		Páginas
<DIR>		BINDER	
<DIR>		Nos:	
<DIR>			
*1JJ2.PDB	8,270,586	-	-
FOLDERB:			
<DIR>			
<DIR>			
*ANISOMYC.PDB	8,383,598	63- 69	1677
*BLASTICI.PDB	8,393,766	70-76	1679
*CARBOMYC.PDB	8,387,042	77- 83	1677
*SPARSOMY.PDB	7,593,360	84- 90	1617
*SPIRAMYC.PDB	8,402,048	91-97	1680
*TYLOSIN.PDB	8,339,400	98 - 104	1668
*VIRGINIA.PDB	7,590,514	105 -111	1617
FOLDERC:			
<DIR>		-	-
<DIR>		-	-
*AZITHROM.PDB	7,989,198	112 – 118	1618
*LINEZOLI.PDB	7,987,583	119-125	1617
Estos archivos se imprimen en los binders mencionados y contenidos en el compact disk N° 1, ambos presentados como parte de la solicitud con la precedente descripción en el binder 1.			

EQUIVALENTES

Por lo tanto, las realizaciones precedentes han de considerarse en todos los aspectos como ilustrativos en lugar de limitantes de la invención descrita en la presente.

- 5 Una copia del disco compacto anteriormente referenciado como disco compacto se presenta simultáneamente con esta solicitud para su inclusión en el expediente público de esta solicitud EPO.

- 10 Como se señaló anteriormente en la descripción, las Figuras 1 a 41 incluyen Figuras en color. Versiones en blanco y negro de estos dibujos también están incluidas en esta solicitud como Figuras 1 “a 33”. Un disco compacto marcado “Figuras” de todas estas figuras, en color y en blanco y negro, se presenta simultáneamente con esta solicitud para su inclusión en el expediente público de esta solicitud.

Esta descripción continúa ahora con el listado de las coordenadas atómicas tomadas del disco compacto 1 y con una lista de las secuencias.

La página siguiente de esta descripción es la página 1 del listado 1JJ2.RTF.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Steitz, Thomas Moore, Peter Ban, Nenad Nissen, Poul Hansen, Jeffrey
 <120> Estructura de ribosoma e inhibidores de la síntesis de proteínas
 <130> RIB-005

<150> US 09/922,251

<151> 2001-08-03

<160> 1

<170> PatentIn version 3.0

5 <210> 1

<211> 33

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> secuencia de oligonucleótidos que debería formar 12 pares de bases

<400> 1 ccggcgggcu gguucaaaccc ggcccgccgg acc 33

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una molécula que se une a una gran subunidad ribosómica, en donde el método comprende las etapas siguientes:
- 5 (a) proveer un modelo molecular que comprende una o más regiones objetivo seleccionadas del grupo que consiste en al menos una porción de: (i) un sitio de unión de anisomicina, (ii) un sitio de unión de azitromicina, (iii) un sitio de unión de blasticidina, (iv) un sitio de unión de carbomicina, (v) un sitio de unión de eritromicina, (vi) un sitio de unión de linezólido, (vii) un sitio de unión de esparsomicina, (viii) un sitio de unión de espiramicina, (ix) un sitio de unión de tilosina, y (x) un sitio de unión de virginiamicina M, en donde el modelo molecular se hace
- 10 (1) a partir de las coordenadas atómicas correspondientes a la gran subunidad ribosómica de *Haloarcula marismortui* que se hallan en el Disco 1 bajo los nombres de archivo ANISOMYCIN.PDB, azithromycin.pdb, BLASTICIDIN.PDB, CARBOMYCIN.PDB, erythromycin.pdb, linezolid.pdb, SPARSOMYCIN.PDB, SPIRAMYCIN.PDB, TYLOSIN.PDB, o VIRGINAMYCIN.PDB, o que se hallan en el Disco 1, bajo FOLDERB, bajo los nombres de archivo ANISOMYC.PDB, BLASTICI.PDB, CARBOMYC.PDB, SPARSOMY.PDB, SPIRAMYC.PDB, TYLOSIN.PDB, VIRGINIA.PDB, o que se hallan en el Disco 1, bajo FOLDERC, bajo los nombres de archivo AZITHROM.PDB, o LINEZOLI.PDB, o
- 15 (2) a partir de las coordenadas atómicas derivadas mediante modelación molecular mediante la utilización de coordenadas correspondientes a la gran subunidad ribosómica de *Haloarcula marismortui* que se hallan en el Disco 1 bajo los nombres de archivo ANISOMYCIN.PDB, azithromycin.pdb, BLASTICIDIN.PDB, CARBOMYCIN.PDB, erythromycin.pdb, linezolid.pdb, SPARSOMYCIN.PDB, SPIRAMYCIN.PDB, TYLOSIN.PDB, o VIRGINAMYCIN.PDB, o que se hallan en el Disco 1, bajo FOLDERB, bajo los nombres de archivo ANISOMYC.PDB, BLASTICI.PDB, CARBOMYC.PDB, SPARSOMY.PDB, SPIRAMYC.PDB, TYLOSIN.PDB, VIRGINIA.PDB, o que se hallan en el Disco 1, bajo FOLDERC, bajo los nombres de archivo AZITHROM.PDB, o LINEZOLI.PDB; y
- 20 (b) el uso del modelo molecular para identificar una molécula candidata que pueda unirse al modelo molecular.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la etapa (a)(2) la modelación molecular consiste en modelación por homología.
- 25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la etapa (a)(2) la modelación molecular consiste en el reemplazo molecular.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la etapa adicional de determinar si la molécula candidata modula actividad ribosómica.
- 30 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende la etapa adicional de repetir una o más de las etapas (a) y (b) para identificar una molécula candidata modificada.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende la etapa adicional de determinar si la molécula candidata modificada modula actividad ribosómica.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las coordenadas atómicas se encuentran en el Disco 1 bajo el nombre de archivo ANISOMYCIN.PDB, o en el Disco 1, bajo FOLDERB, bajo el nombre de archivo ANISOMYC.PDB.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las coordenadas atómicas se encuentran en el Disco 1 bajo el nombre de archivo azithromycin.pdb o en el Disco 1, bajo FOLDERC, bajo el nombre de archivo AZITHROM.PDB.
- 40 9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las coordenadas atómicas se encuentran en el Disco 1 bajo el nombre de archivo BLASTICIDIN.PDB o en el Disco 1, bajo FOLDERB, bajo el nombre de archivo BLASTICI.PDB.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las coordenadas atómicas se encuentran en el Disco 1 bajo el nombre de archivo CARBOMYCIN.PDB o en el Disco 1, bajo FOLDERB, bajo el nombre de archivo CARBOMYC.PDB.
- 45 11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las coordenadas atómicas se encuentran en el Disco 1 bajo el nombre de archivo erythromycin.pdb.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las coordenadas atómicas se encuentran en el Disco 1 bajo el nombre de archivo linezolid.pdb o en el Disco 1, bajo FOLDERC, bajo el nombre de archivo LINEZOLI.PDB.
- 50 13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las coordenadas atómicas se encuentran en el Disco 1 bajo el nombre de archivo SPARSOMYCIN.PDB, o en el Disco 1, bajo FOLDERB, bajo el nombre de archivo SPARSOMY.PDB.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las coordenadas atómicas se encuentran en el Disco 1 bajo el nombre de archivo SPIRAMYCIN.PDB o en el Disco 1, bajo FOLDERB, bajo el nombre de archivo SPIRAMYC.PDB.
- 5 15. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las coordenadas atómicas se encuentran en el Disco 1 bajo el nombre de archivo TYLOSIN.PDB o en el Disco 1, bajo FOLDERB, bajo el nombre de archivo TYLOSIN.PDB,
16. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las coordenadas atómicas se encuentran en el Disco 1 bajo el nombre de archivo VIRGINIAMYCIN.PDB o en el Disco 1, bajo FOLDERB, bajo el nombre de archivo VIRGINIA.PDB.

Figura 1

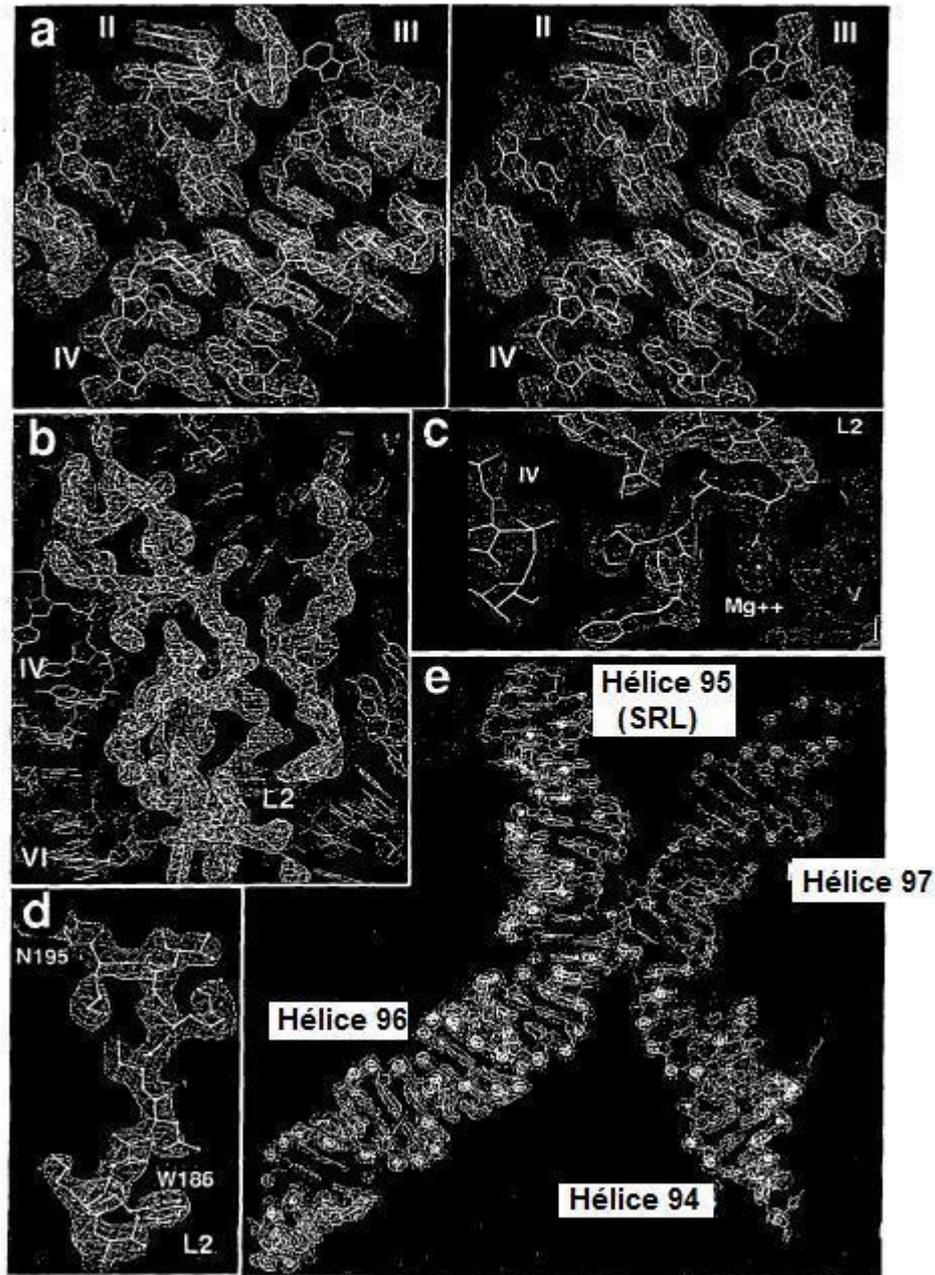
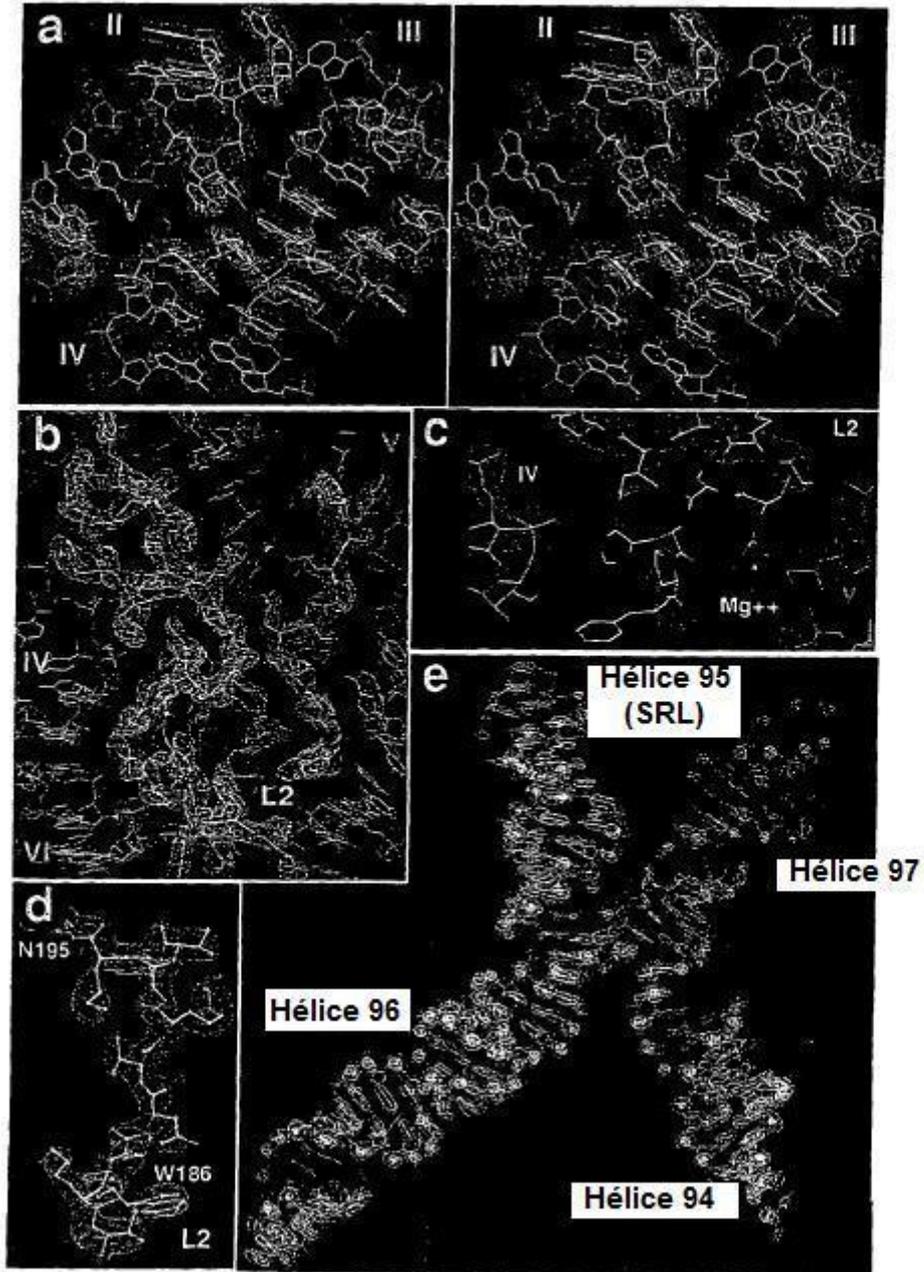


Figura 1'



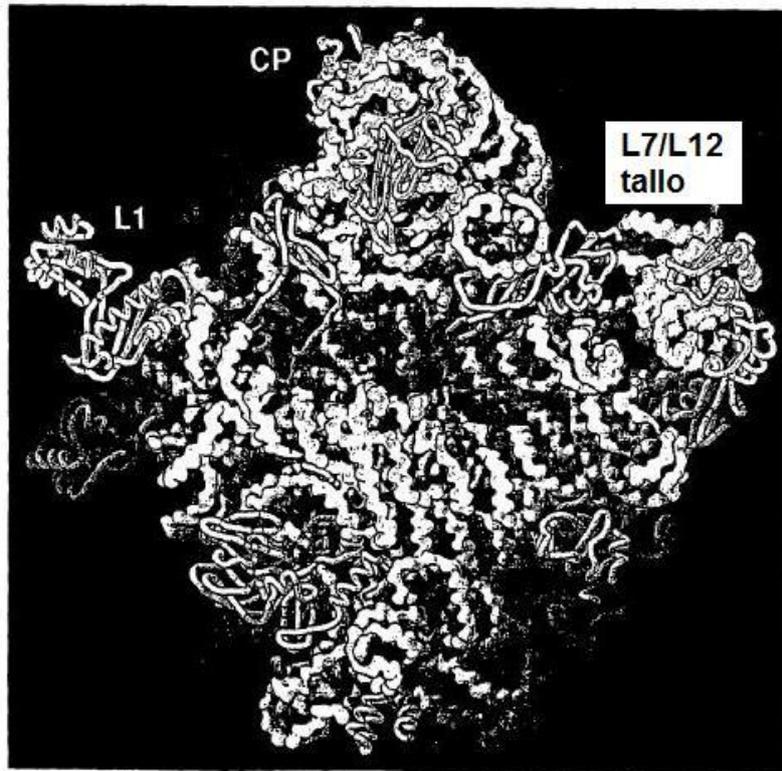


FIG. 2

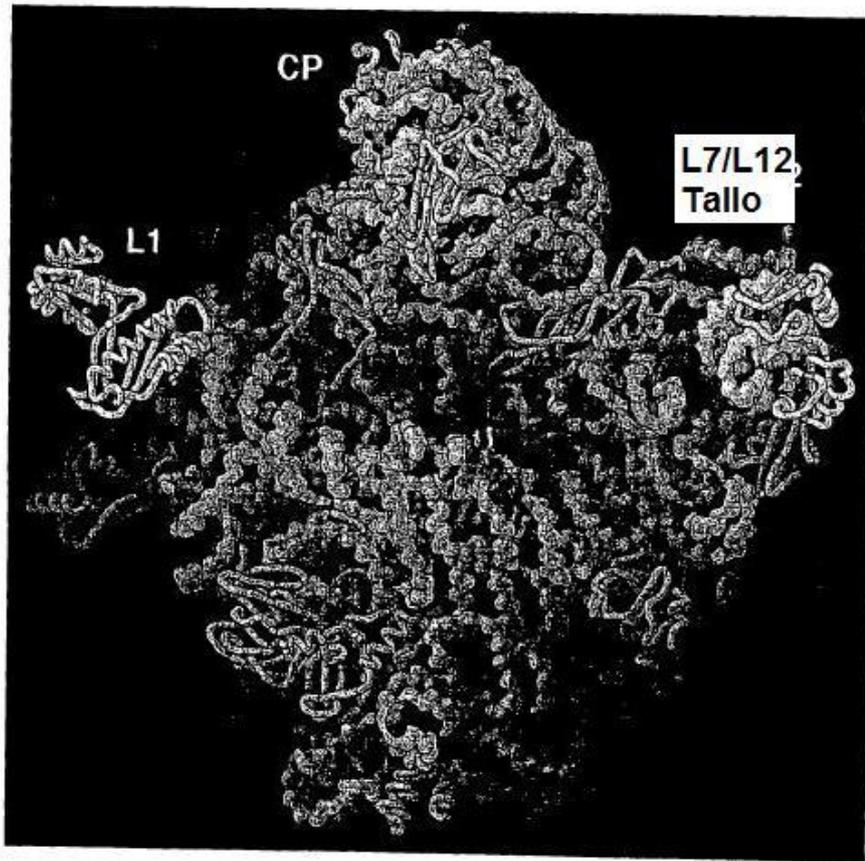


FIG. 2'

Figura 3A

Estructura secundaria: gran unidad ribosómica: ARN-5' medio

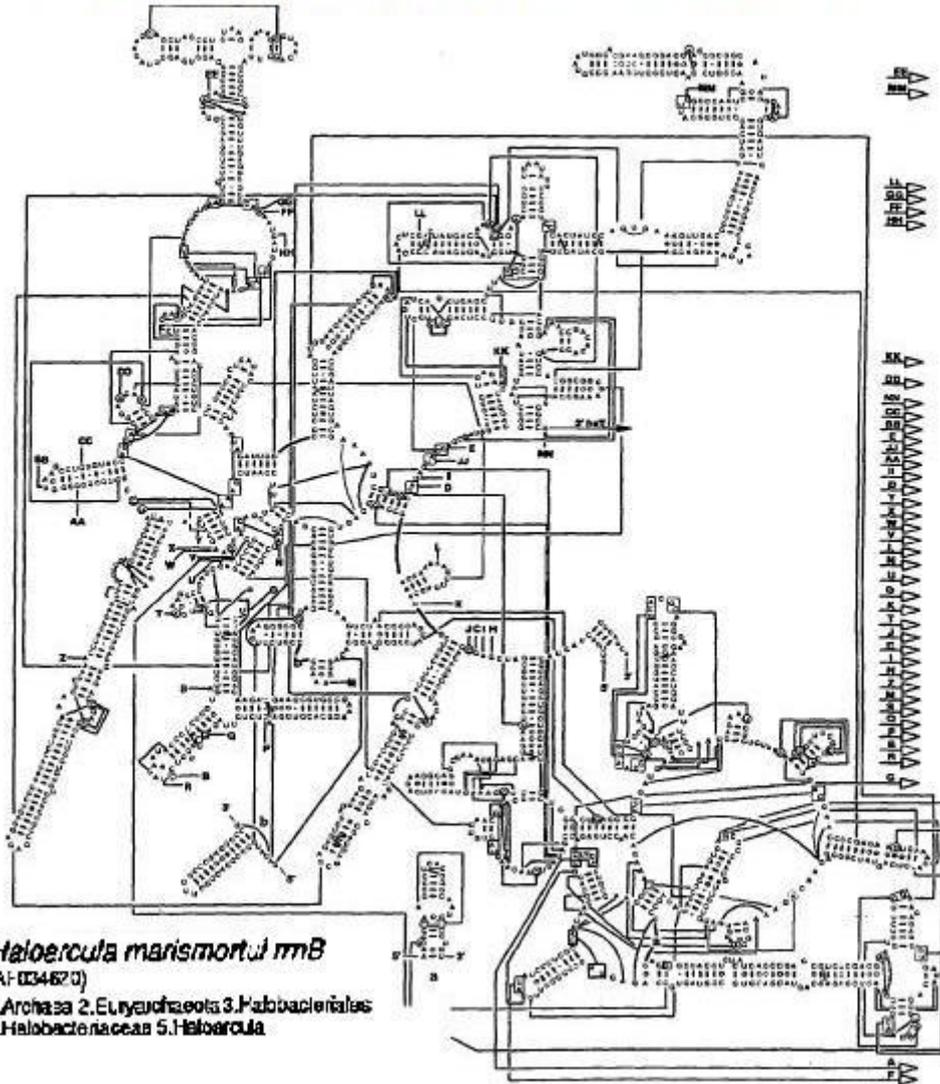


Figura 3A'

Estructura secundaria: gran subunidad ribosómica ARN 3' medio

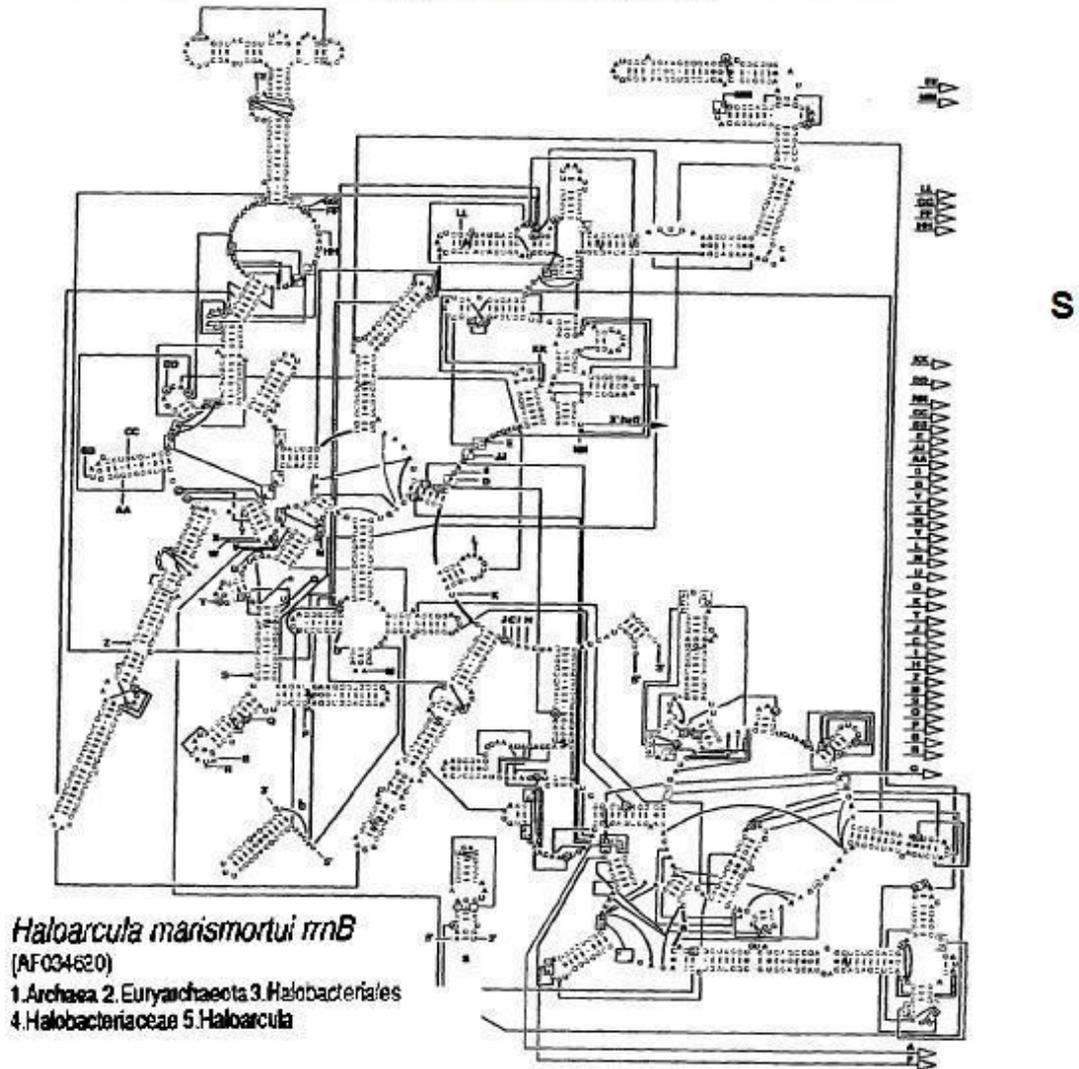
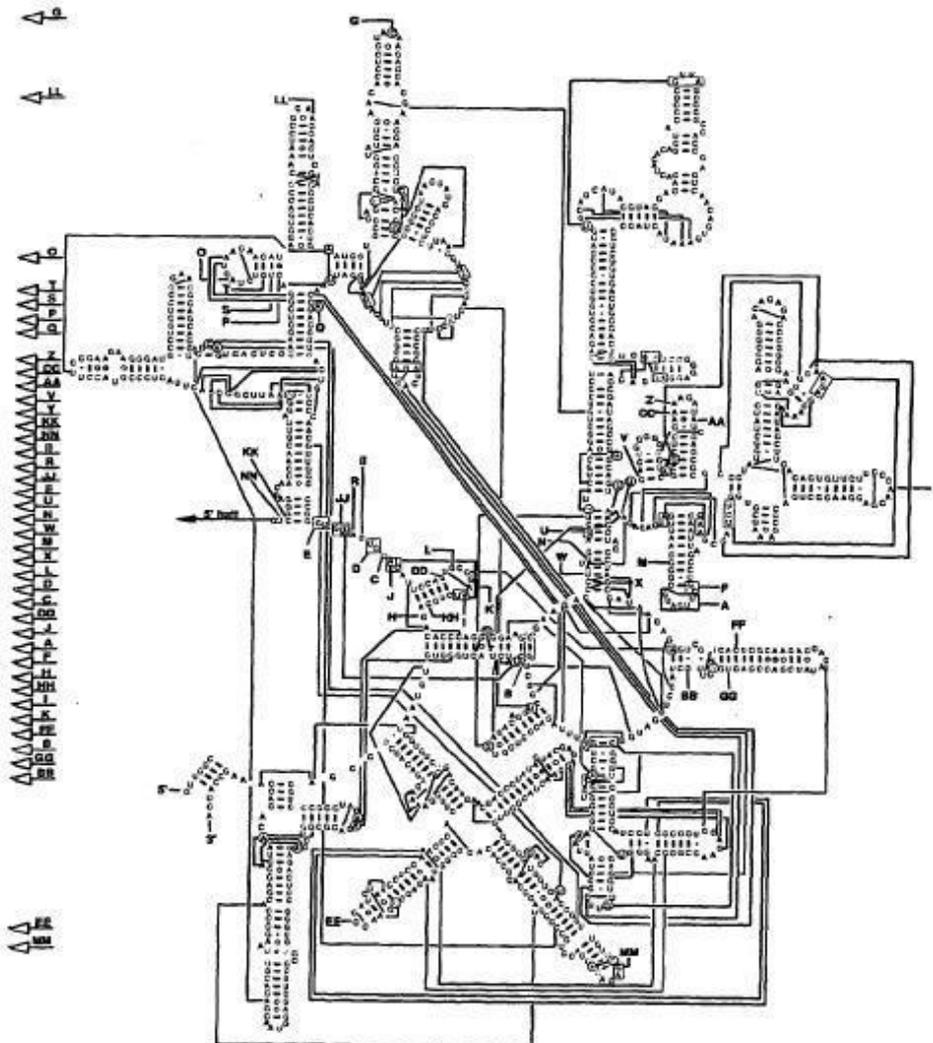


Figura 3B

Estructura secundaria: gran subunidad ribosómica ARN -3' medio



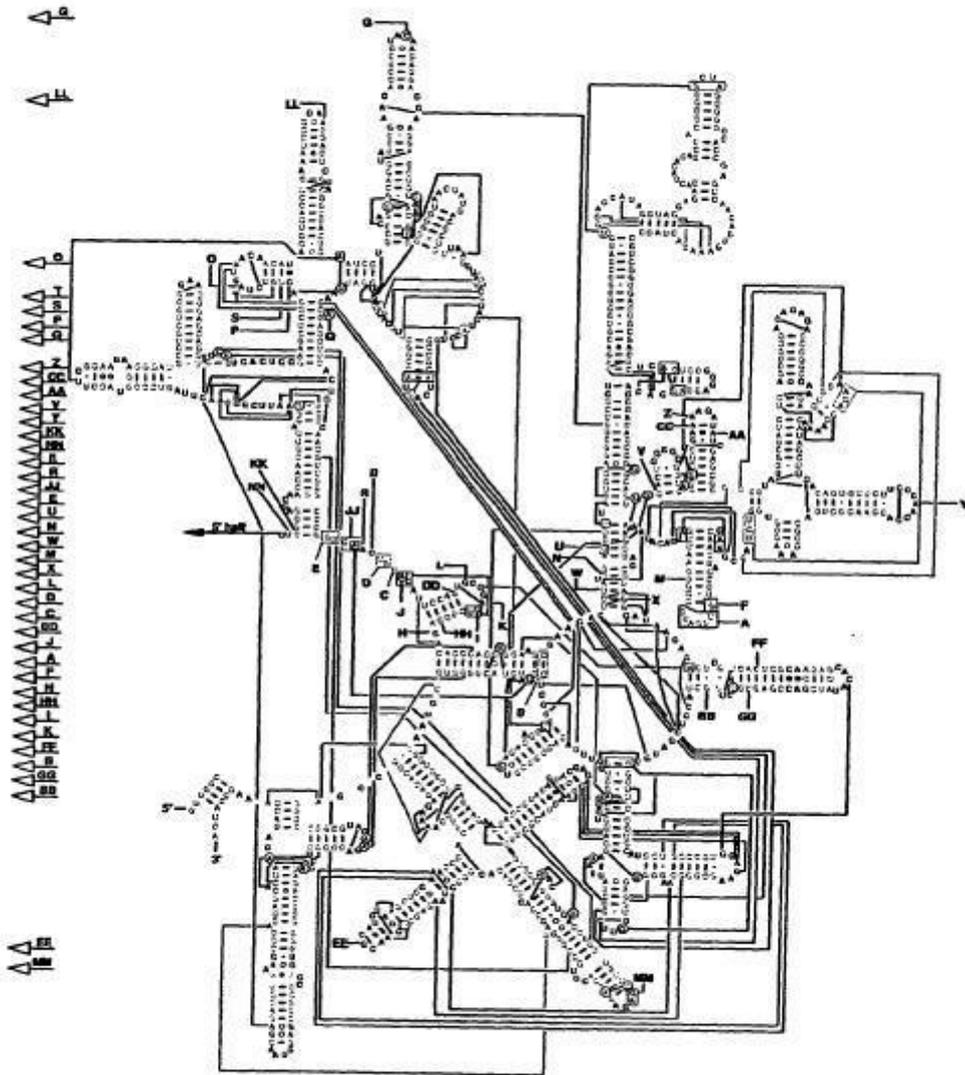
Haloarcula marismortui *rrnB*

(AF034620)

1. Archaea 2. Euryarchaeota 3. Halobacteriales
4. Halobacteriaceae 5. Haloarcula

Figura 3B'

Estructura secundaria: gran subunidad ribosómica ARN 3' medio



Haloarcula marismortui rrnB
(AF034620)

1. Archaea
2. Euryarchaeota
3. Halobacteriales
4. Halobacteriaceae
5. Haloarcula

Figura 4

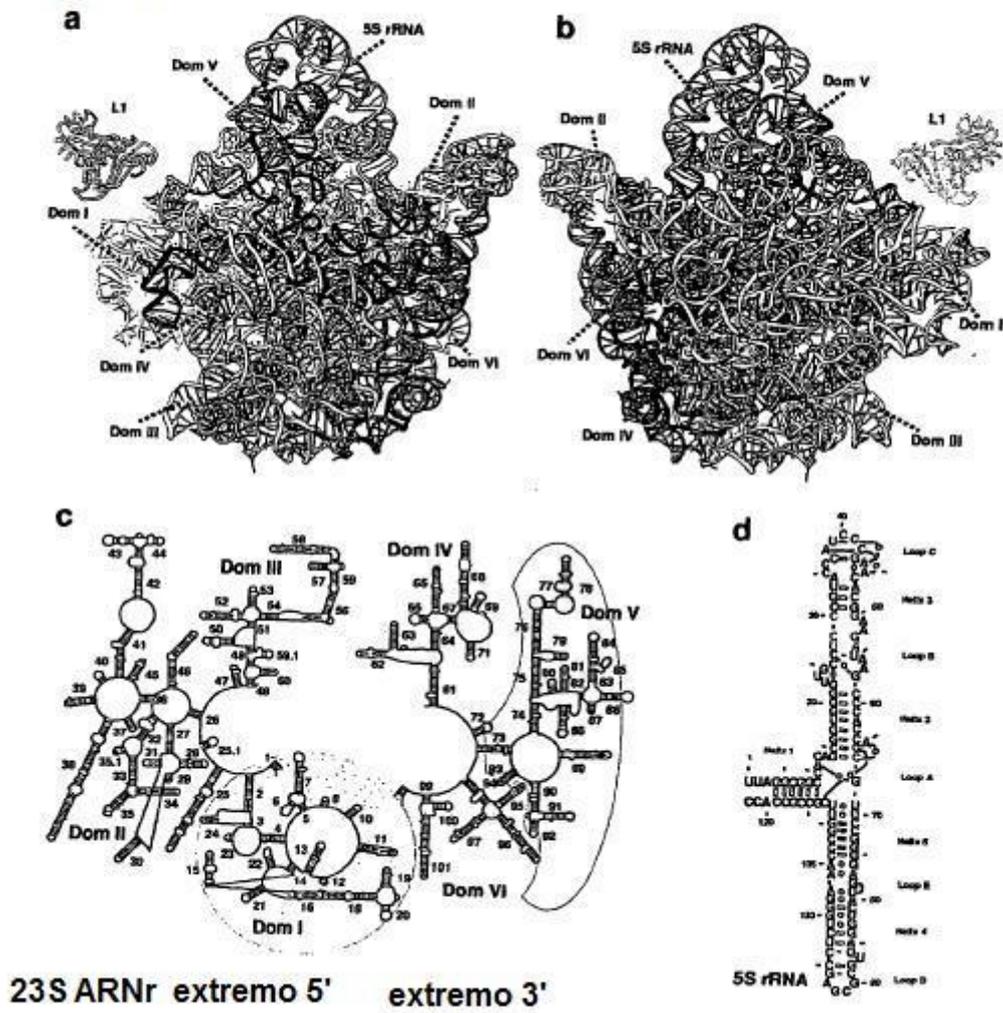


Figura 4

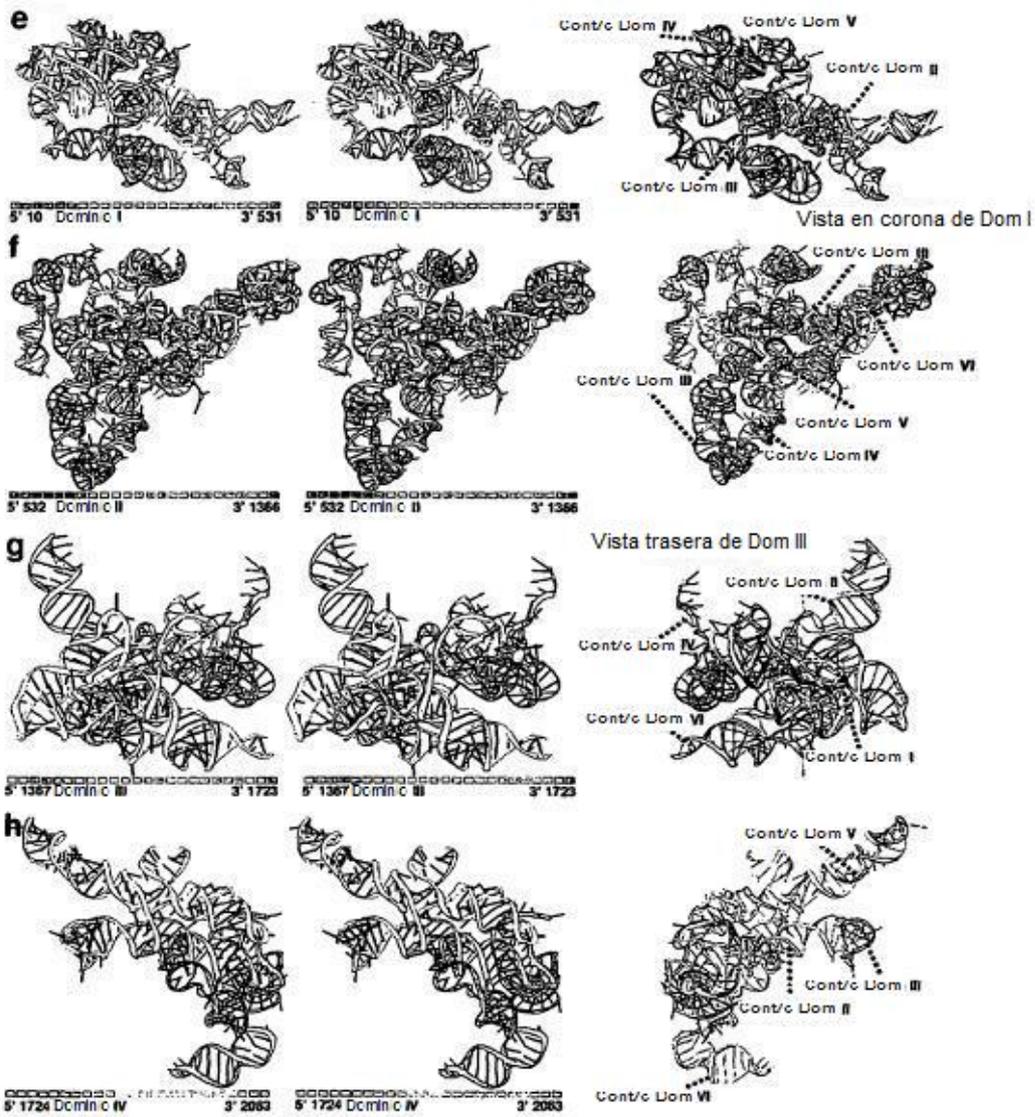


Figura 4'

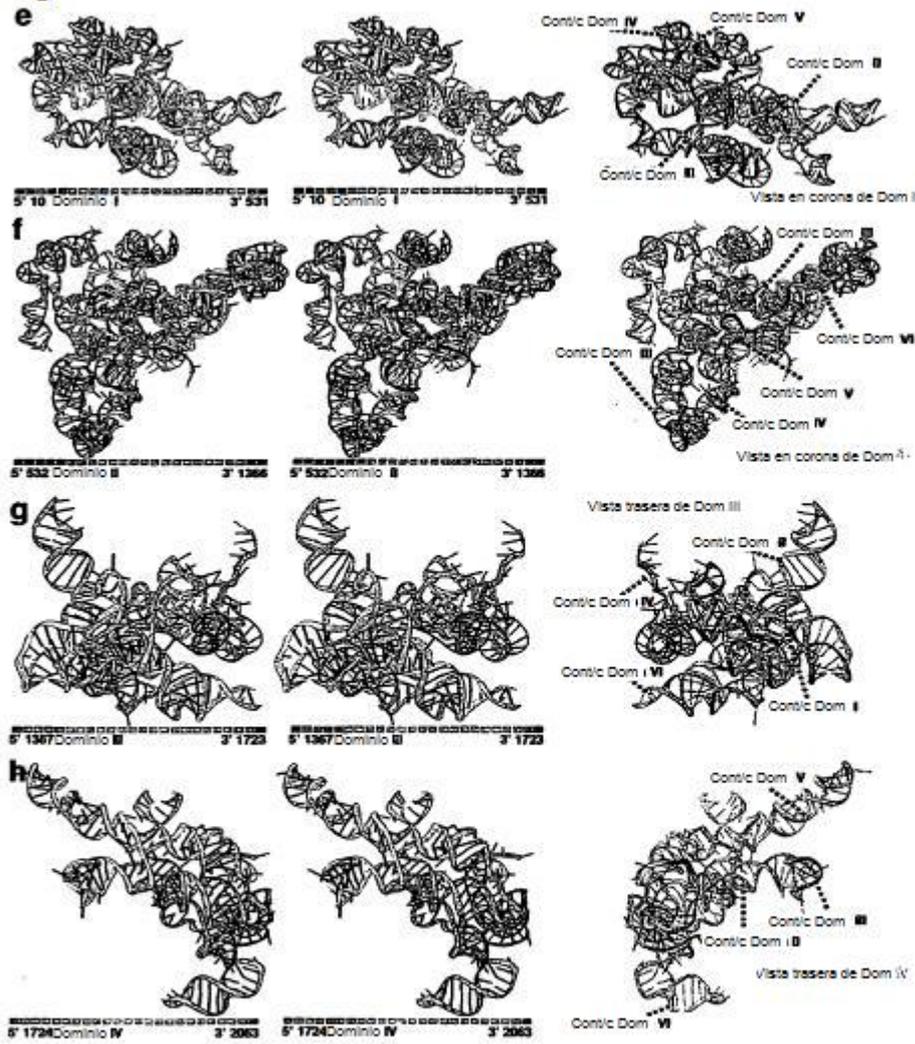


Figura 4

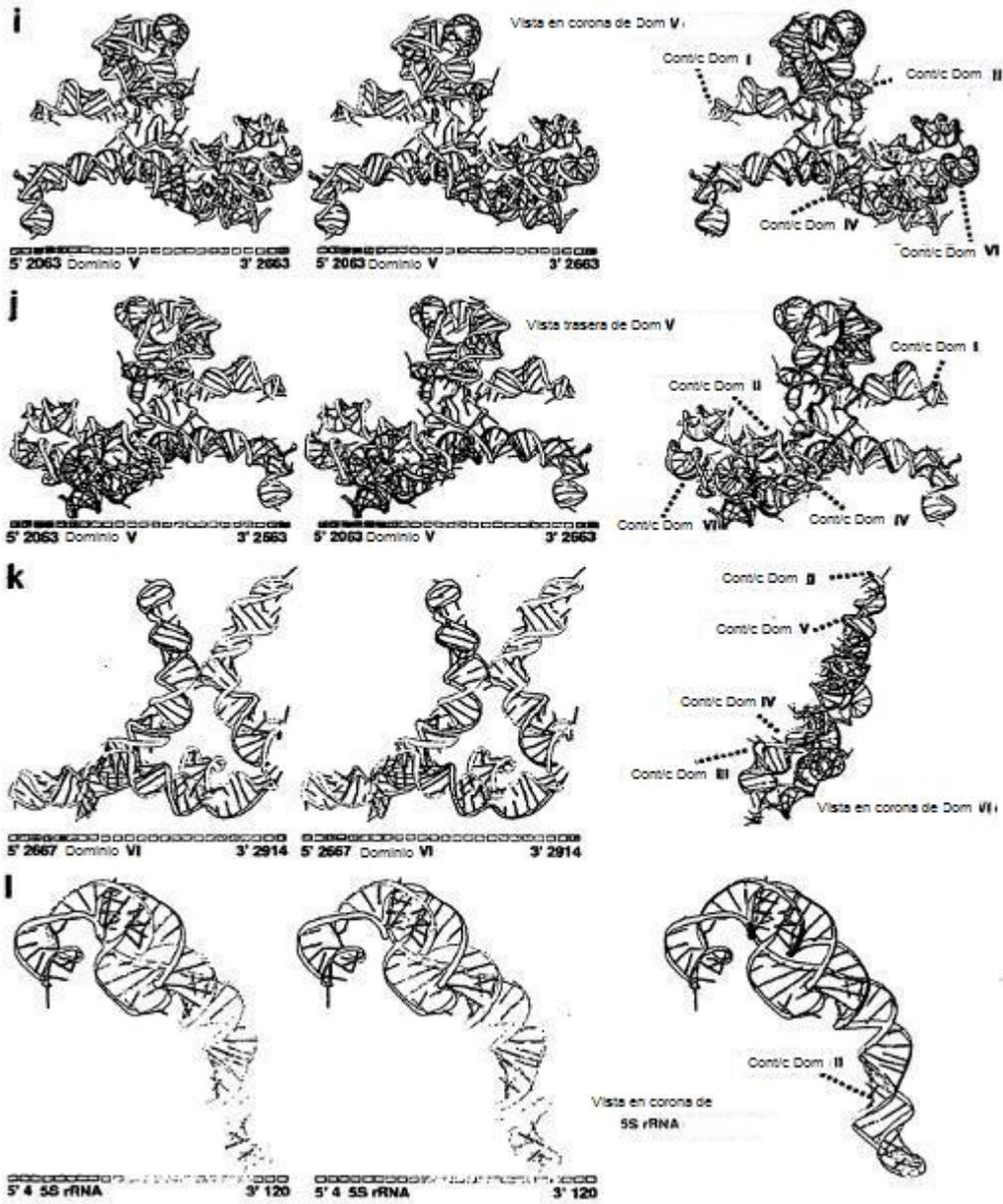
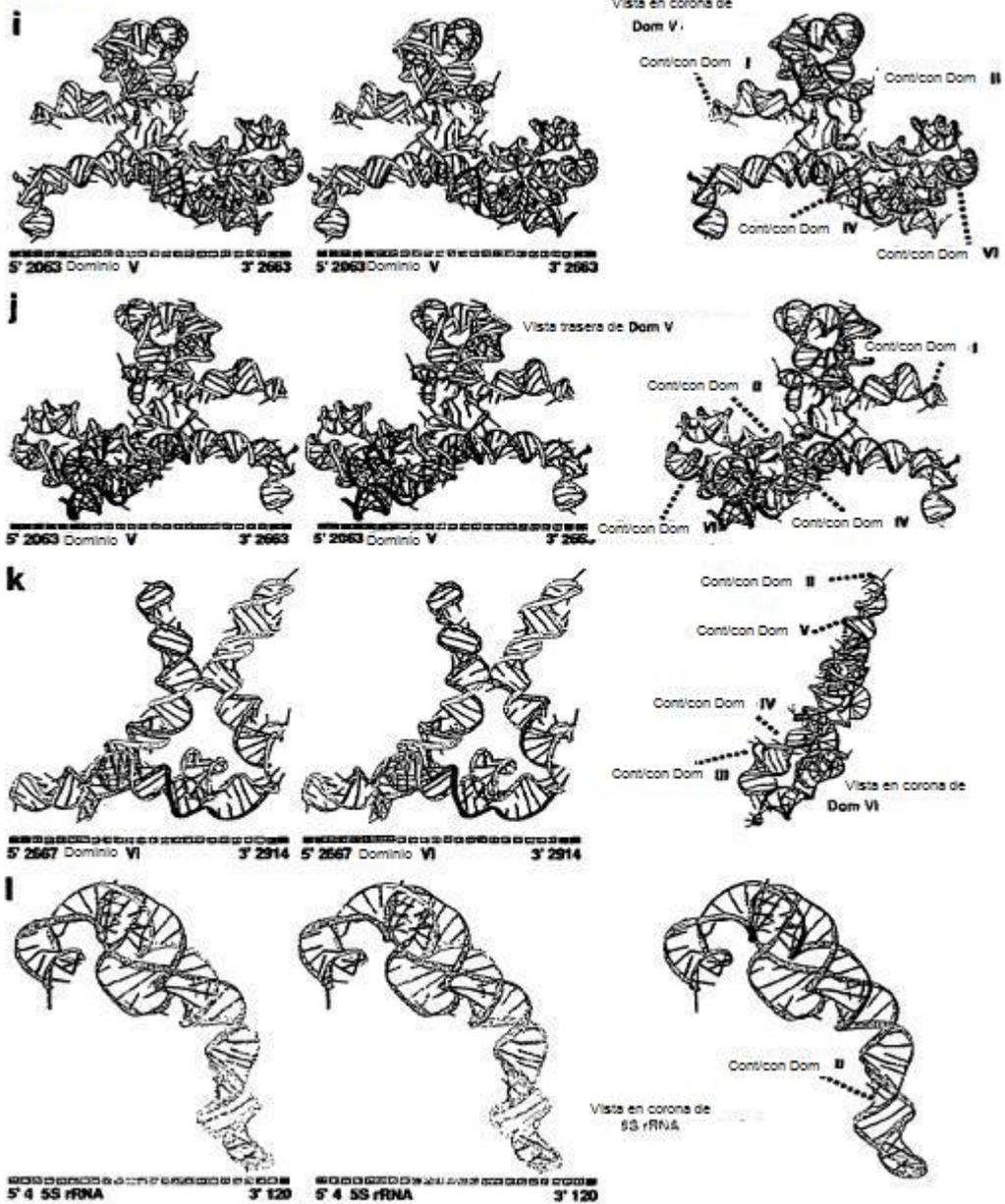


Figura 4'



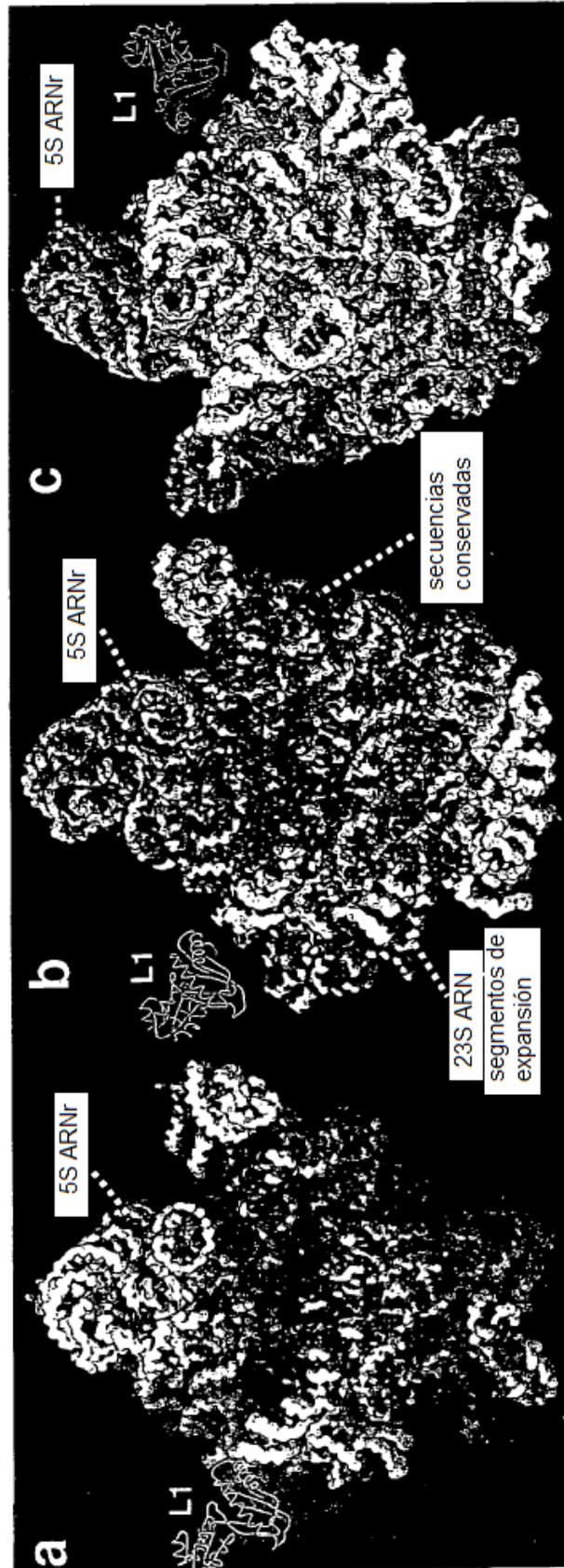


FIG. 5

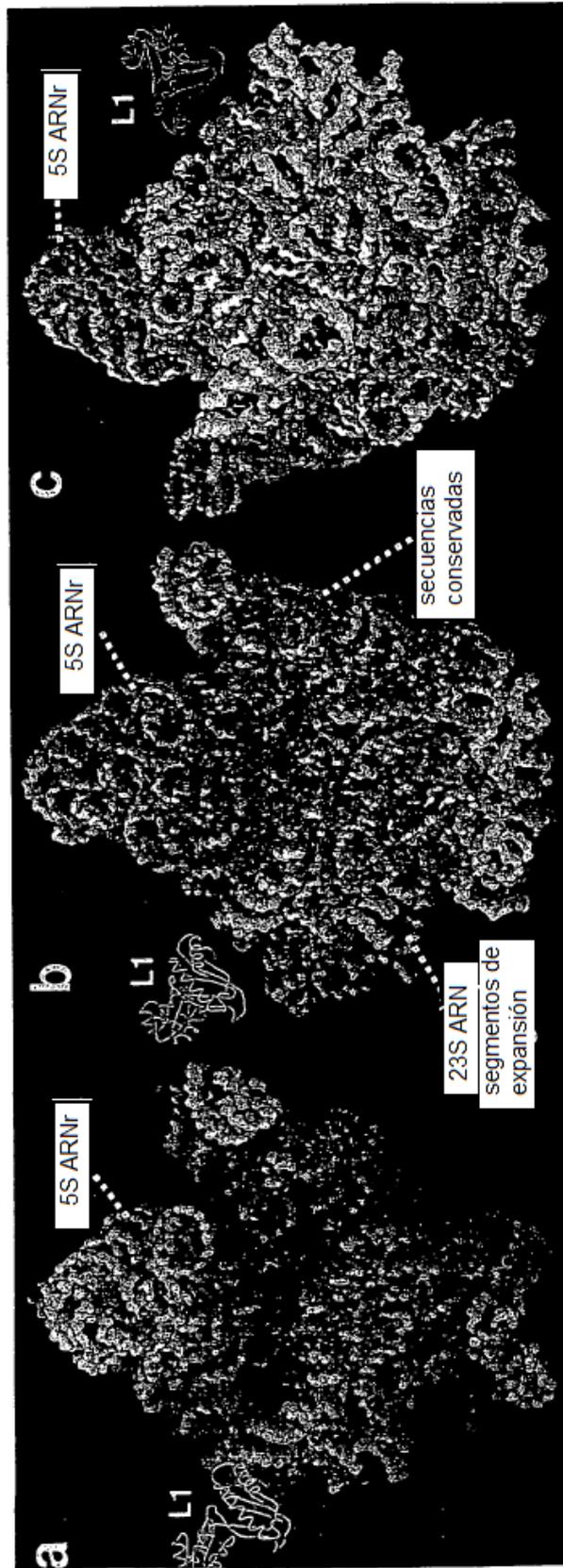


FIG. 5'

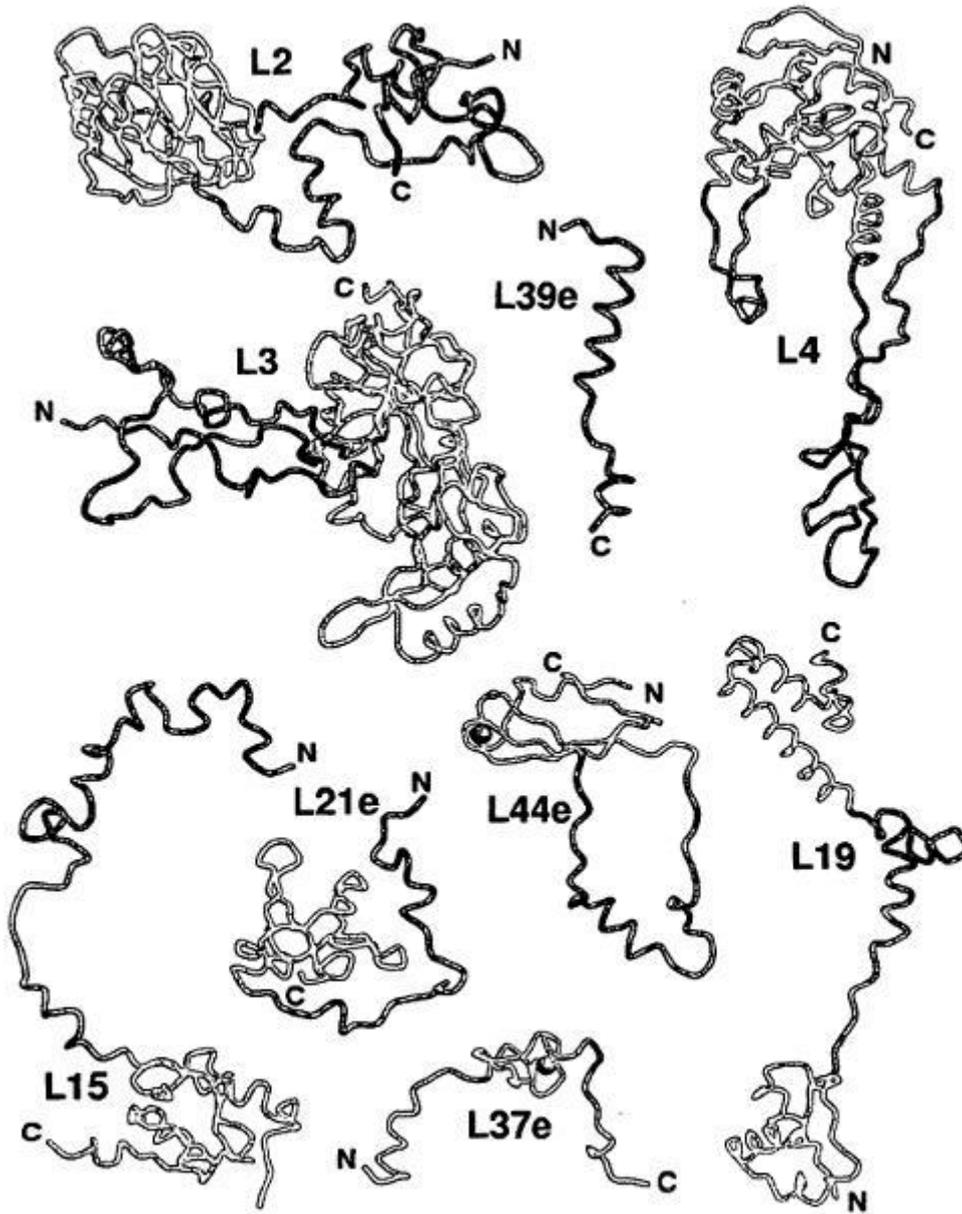


FIG. 6

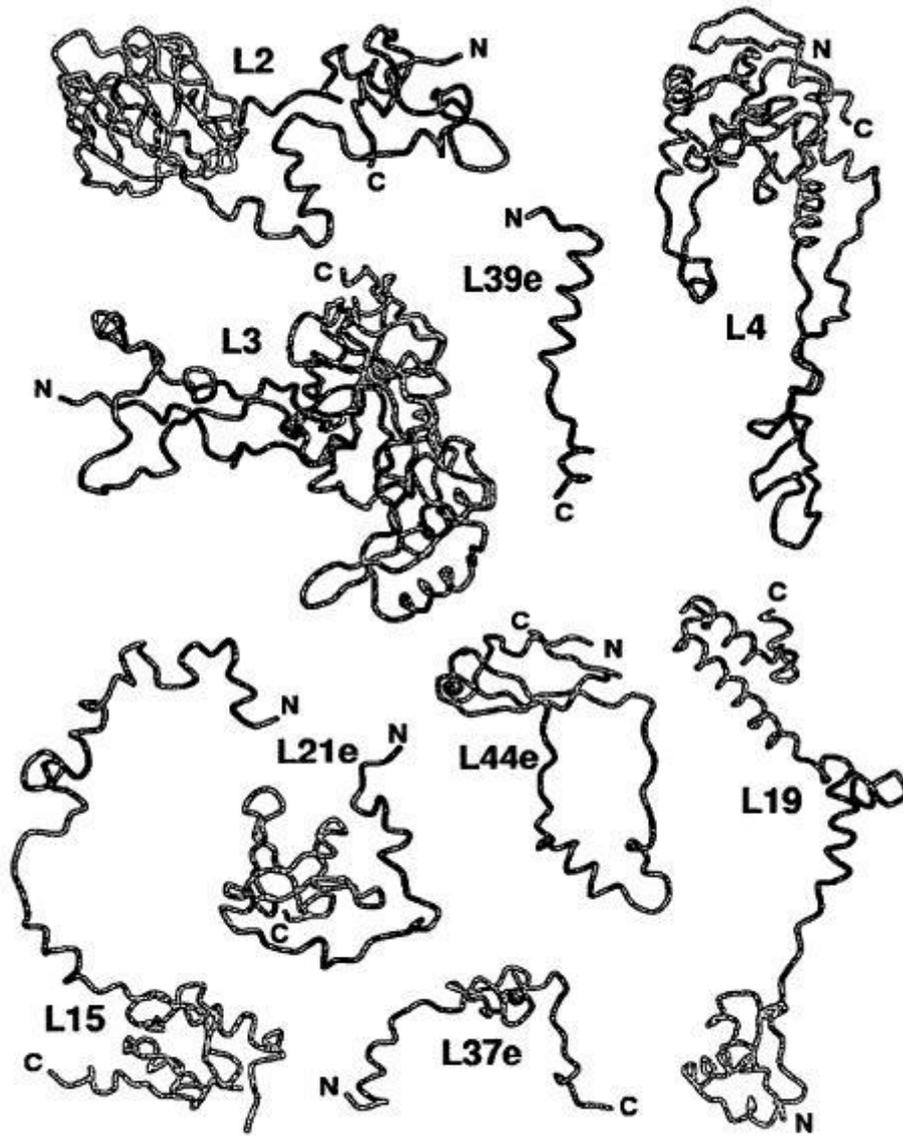


FIG. 6'

Figura 7

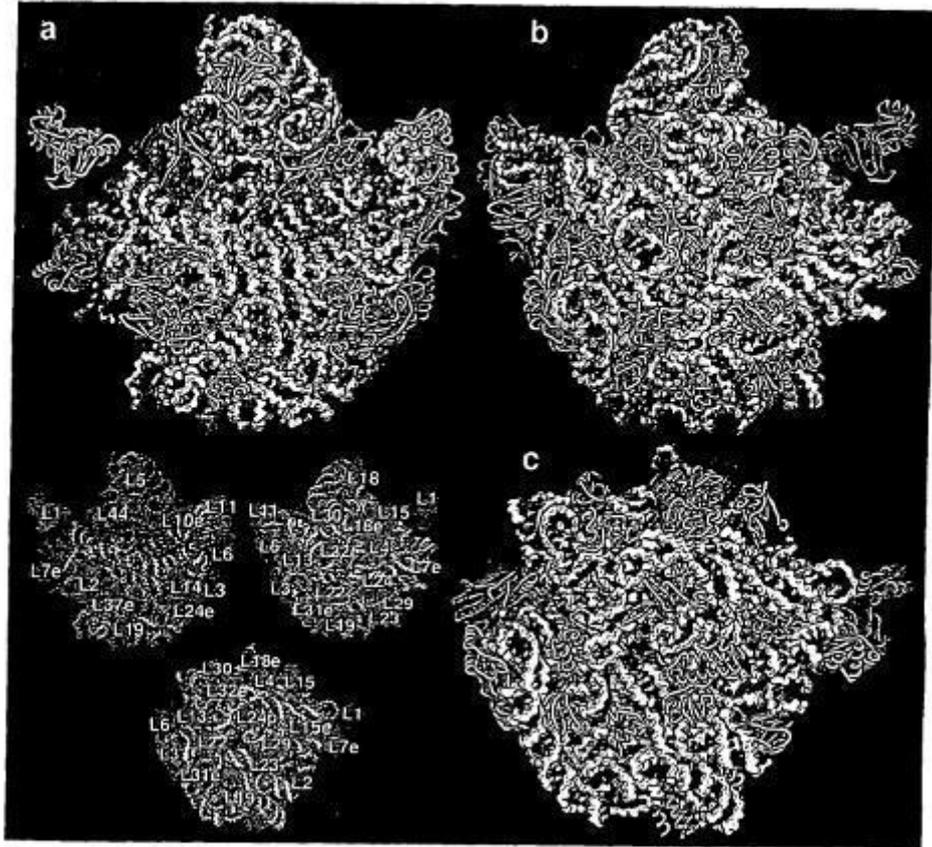


Figura 7'

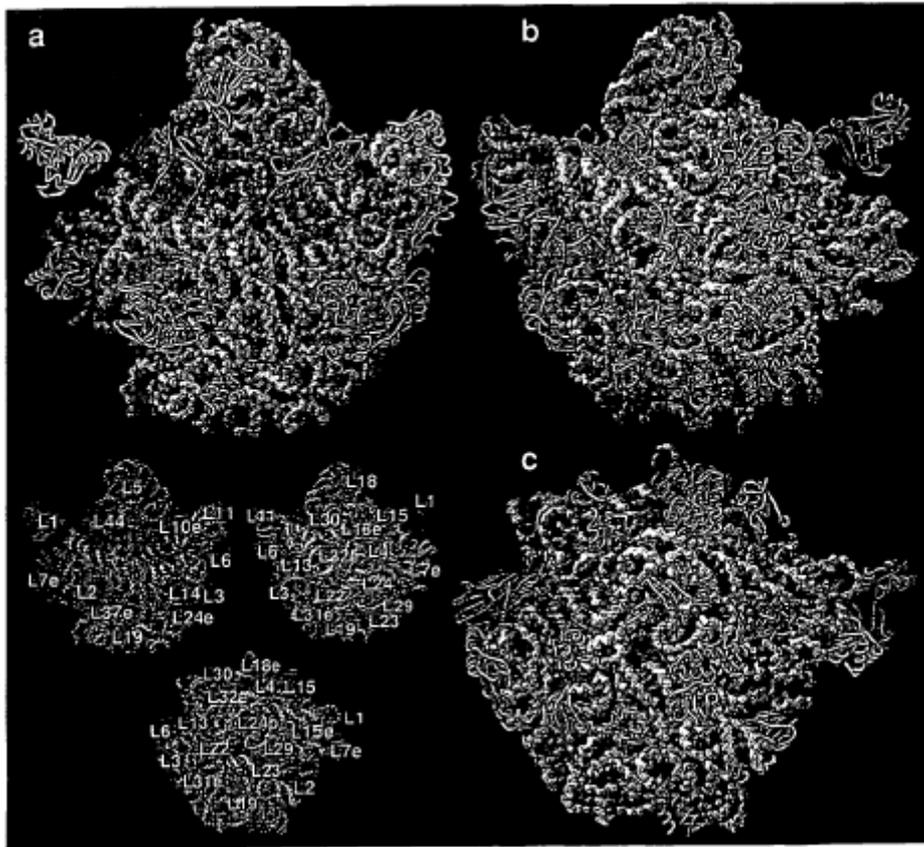


Figura 8

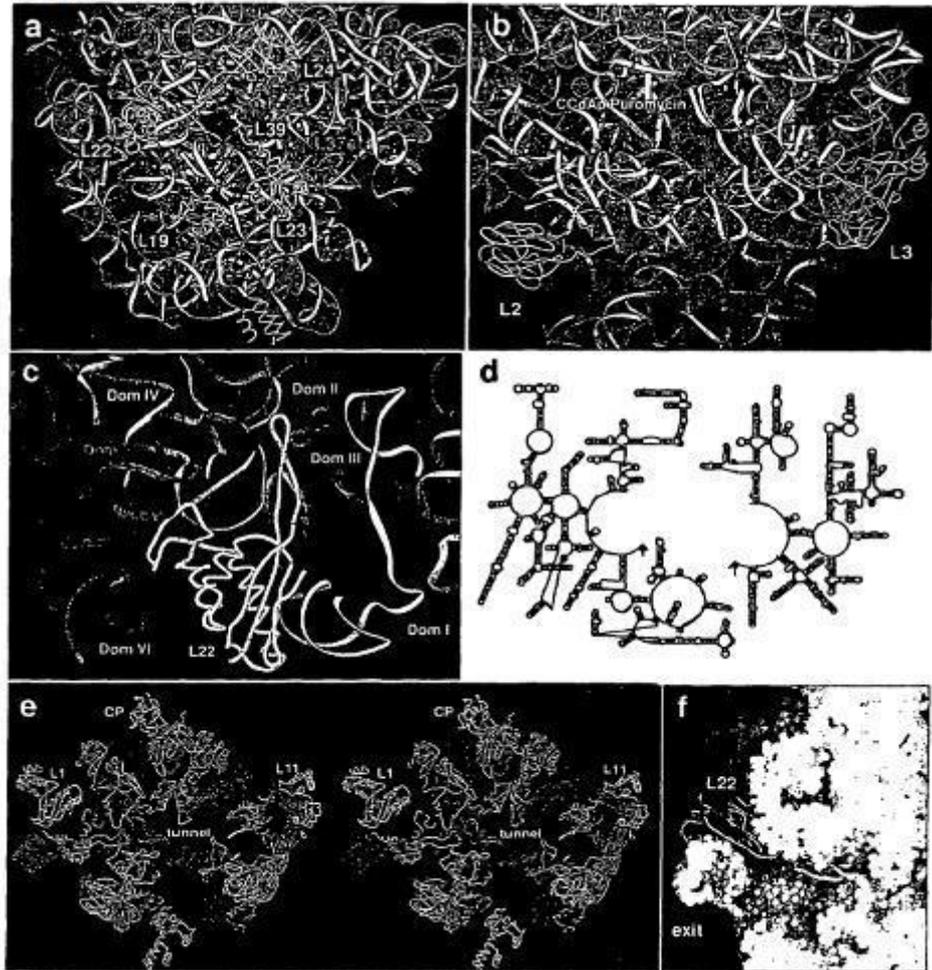
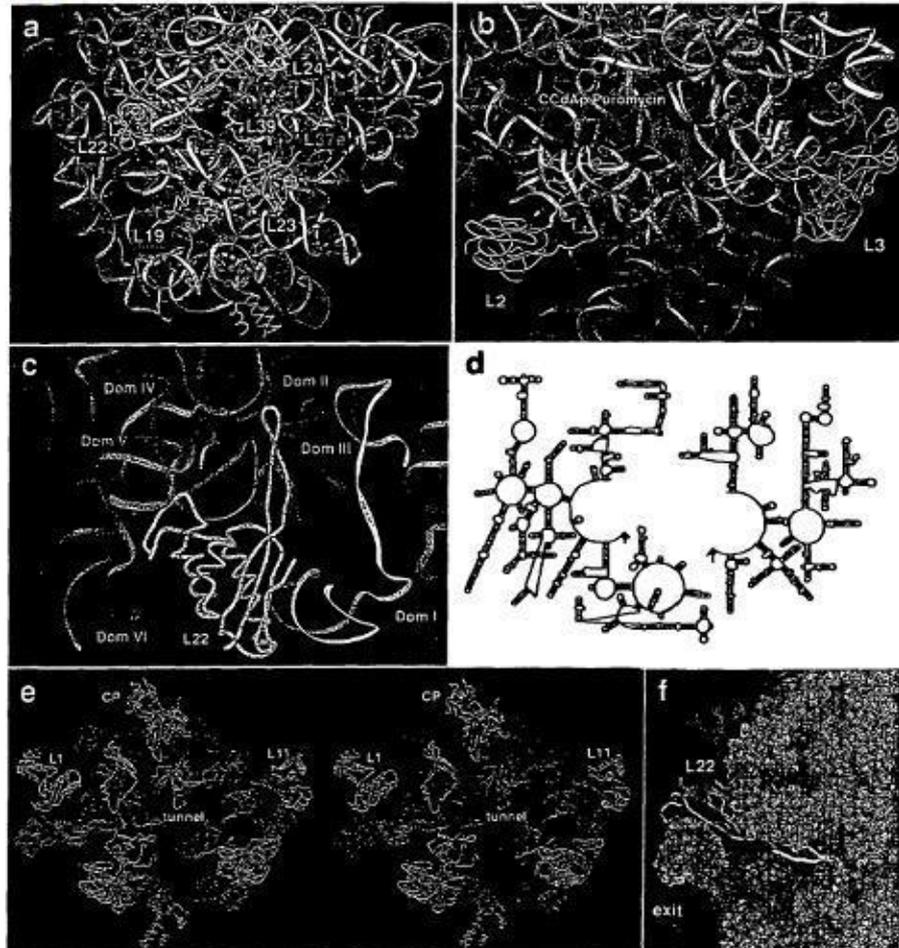


Figura 8'



A Compuesto intermedio peptidil transferasa

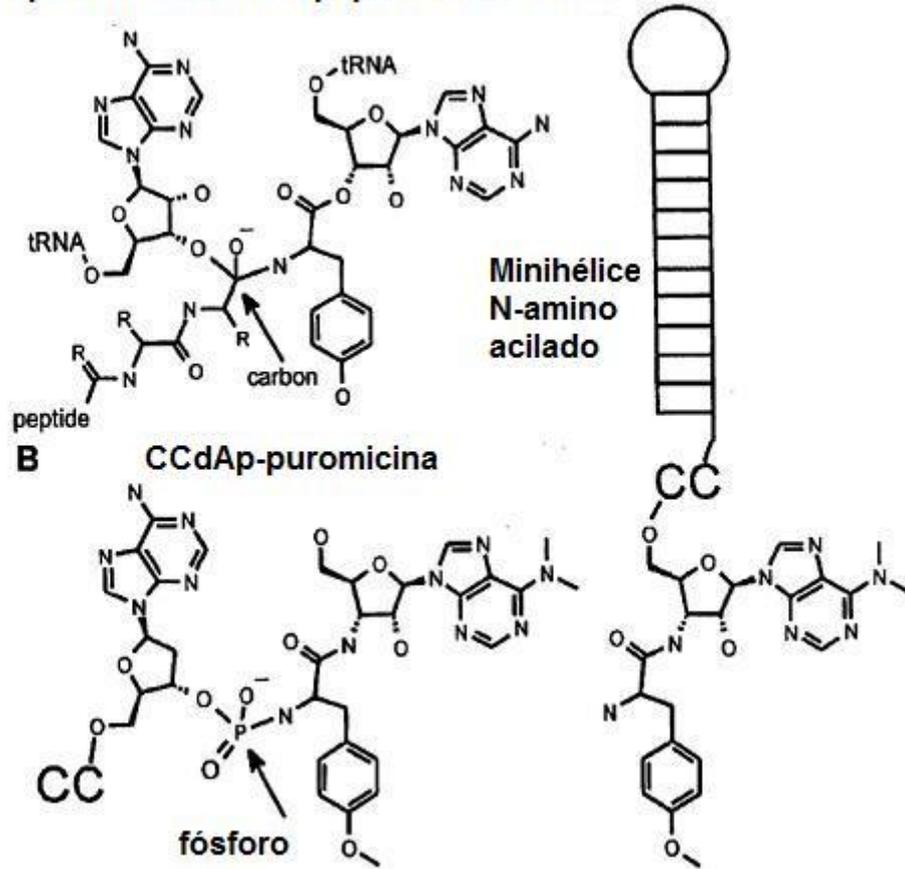


FIG. 9

Figura 10

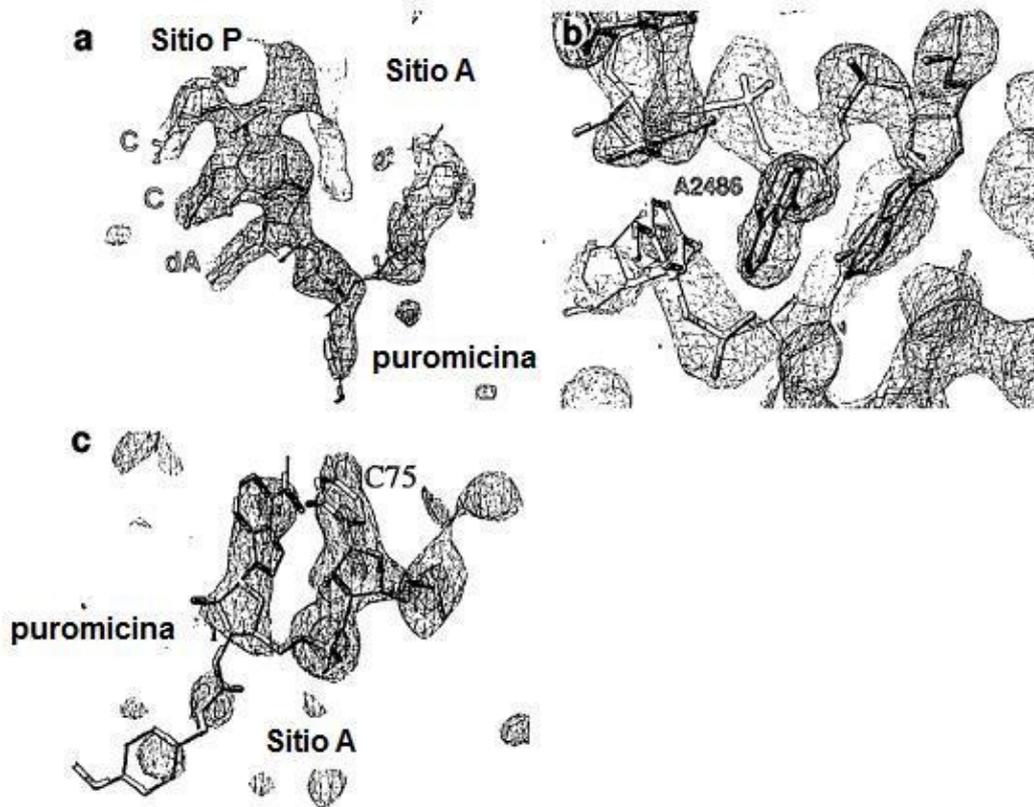
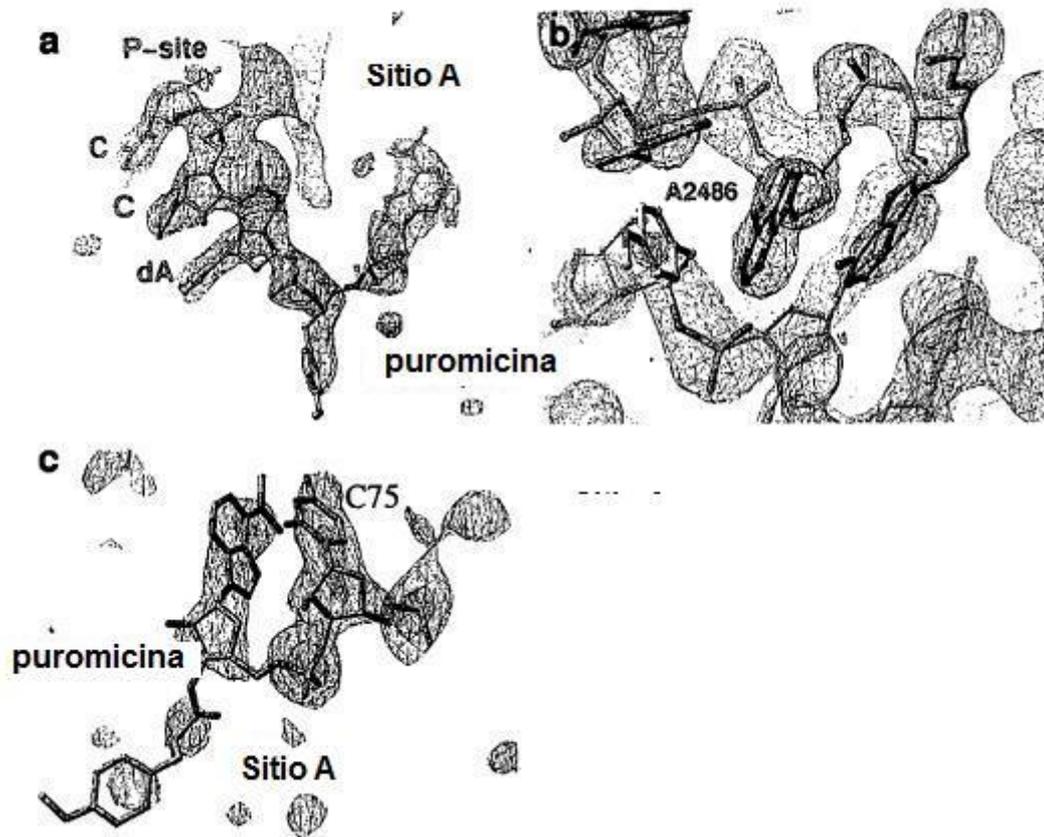


Figura 10



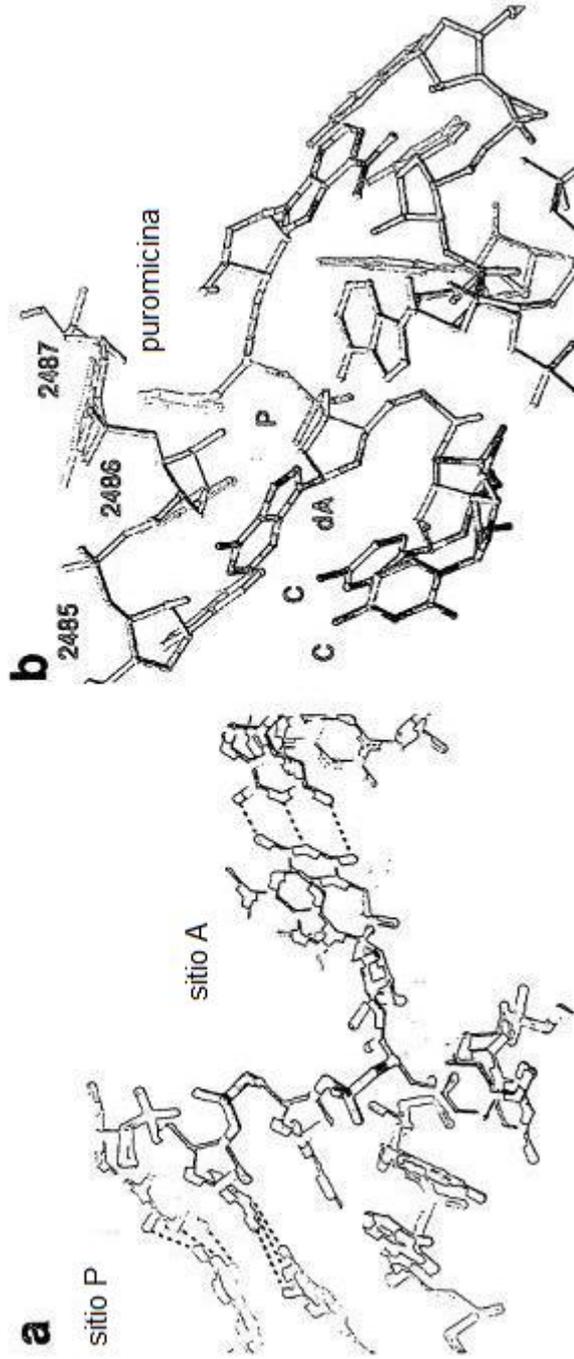


FIG. 11

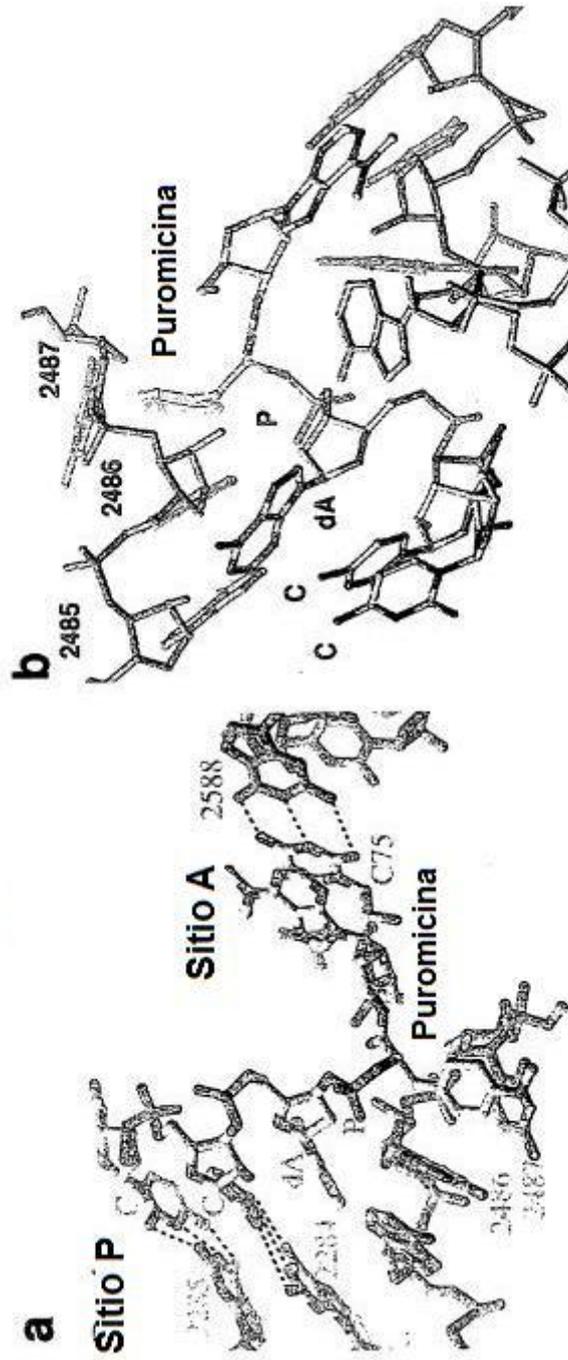


FIG. 11'

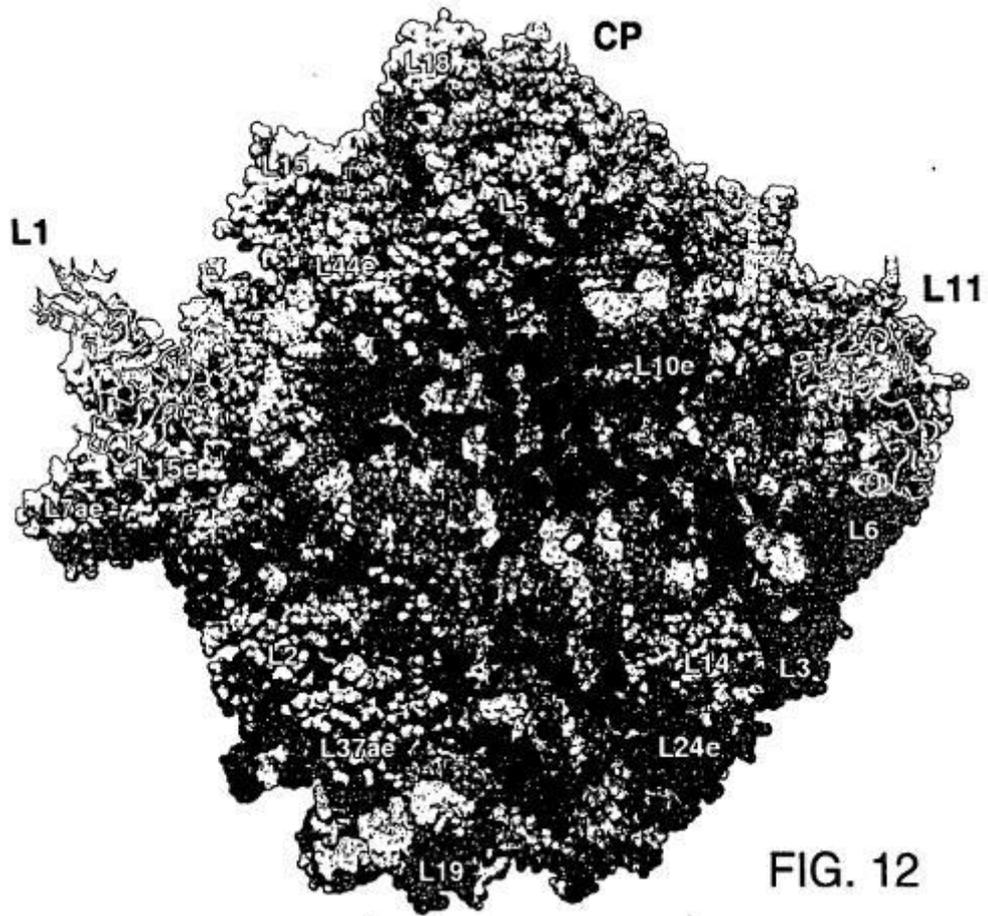
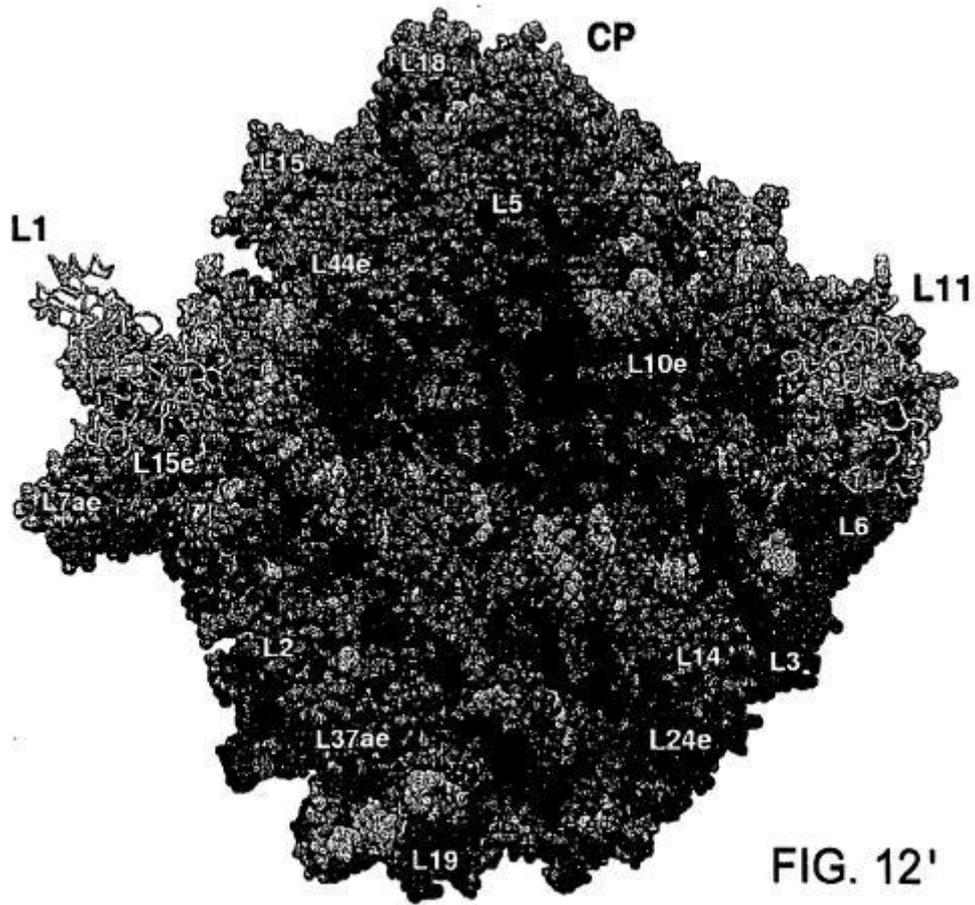
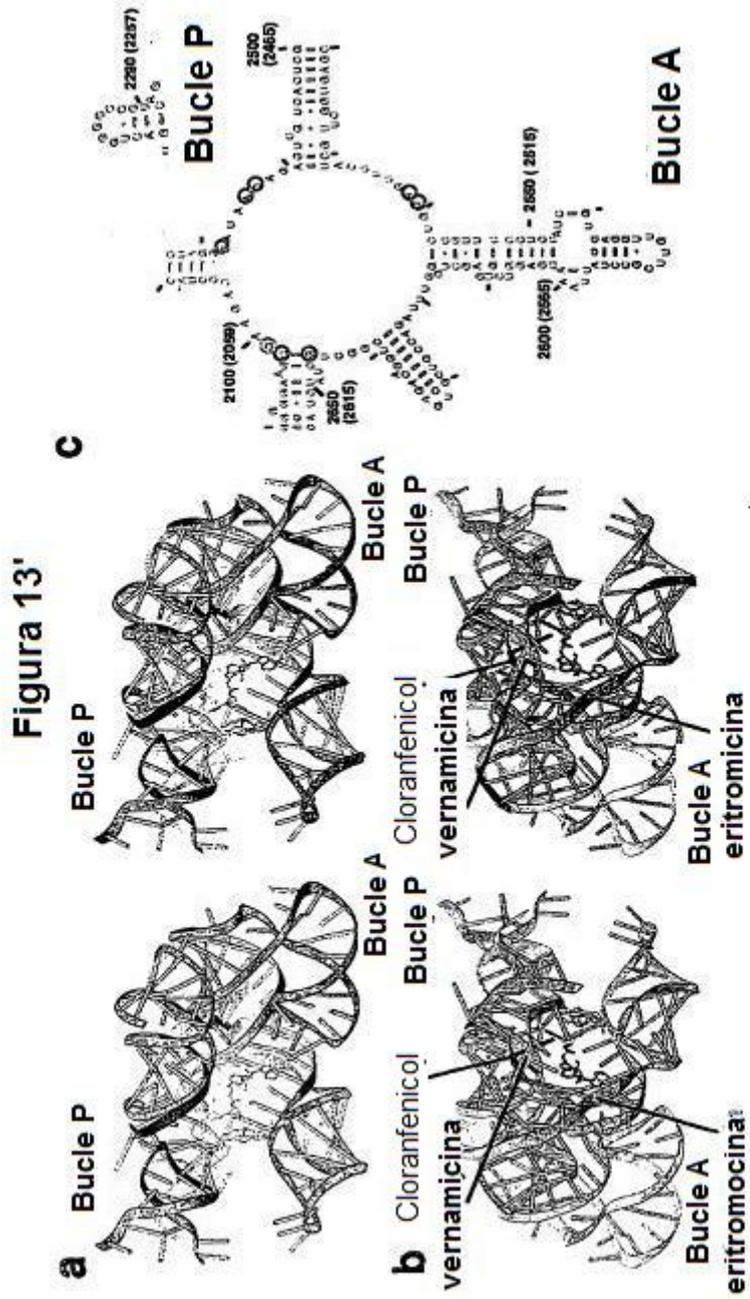


FIG. 12





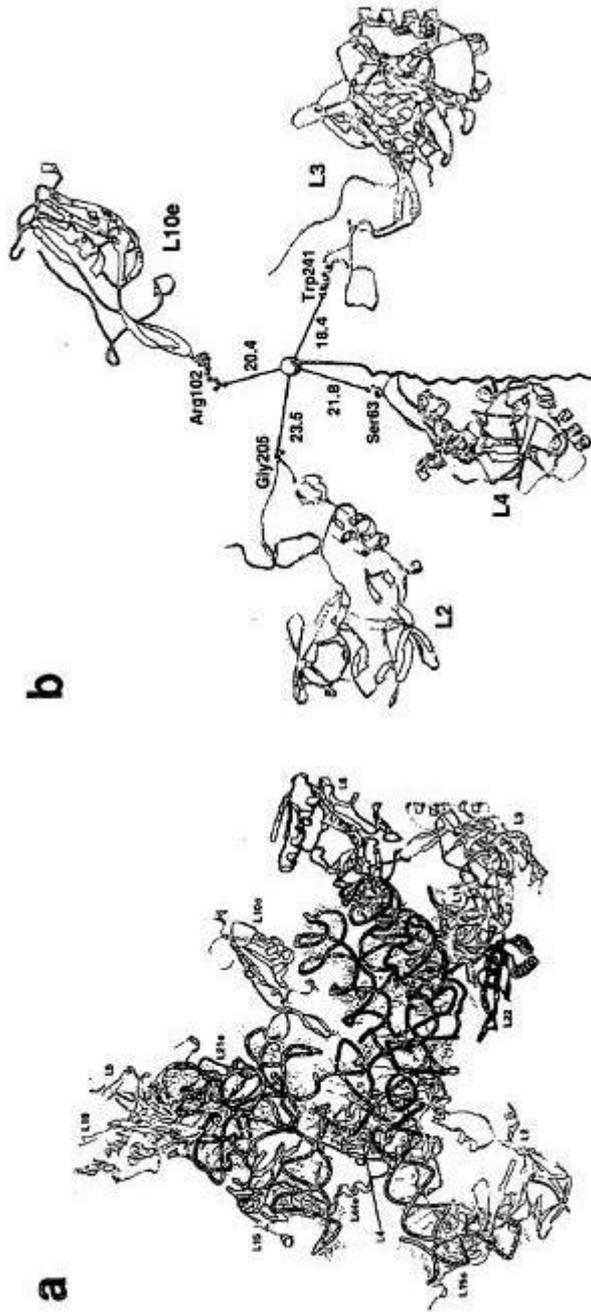


FIG. 14

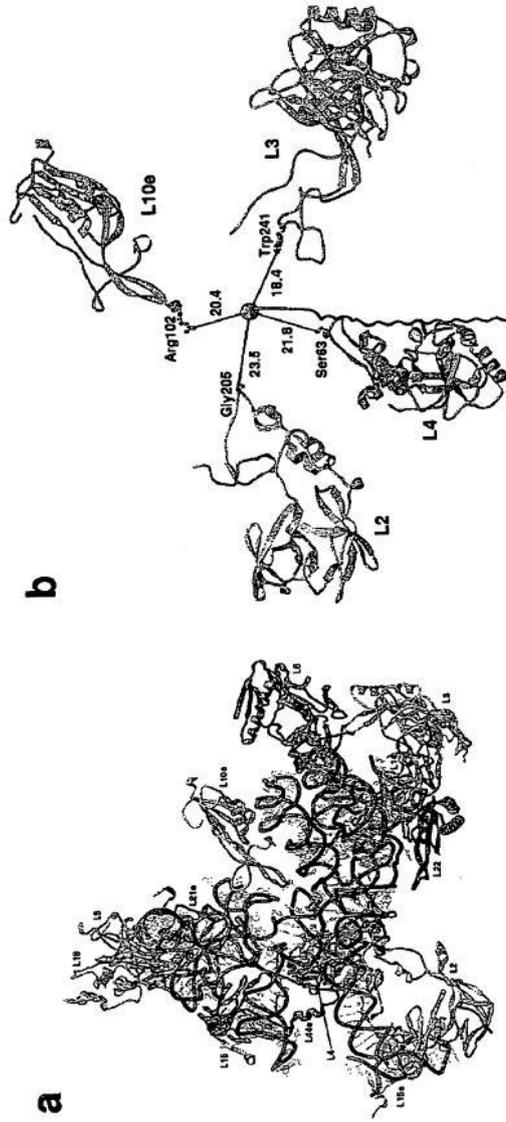


FIG. 14'

Figura 17

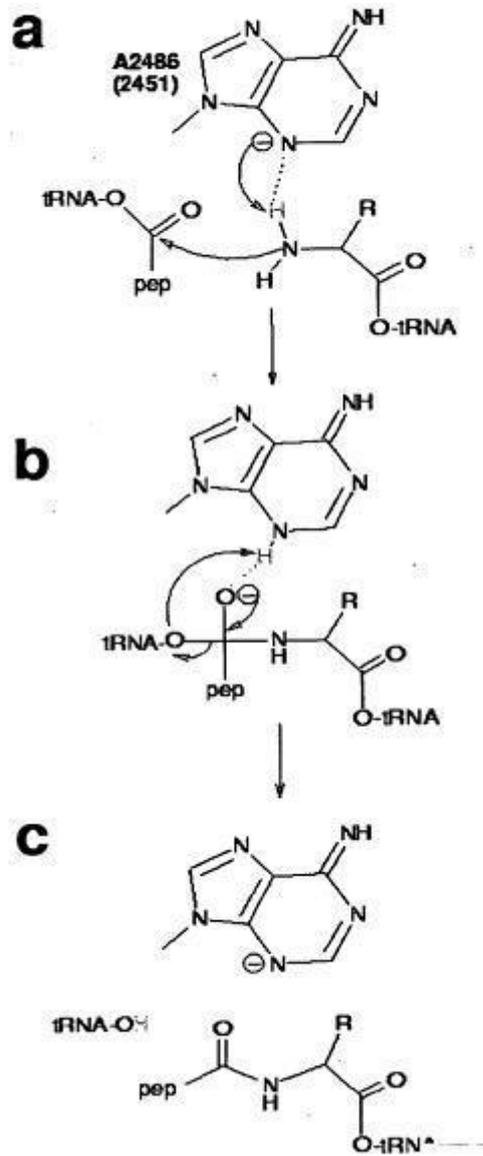


Figura 15

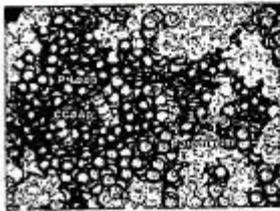


Figura 17'

Figura 15

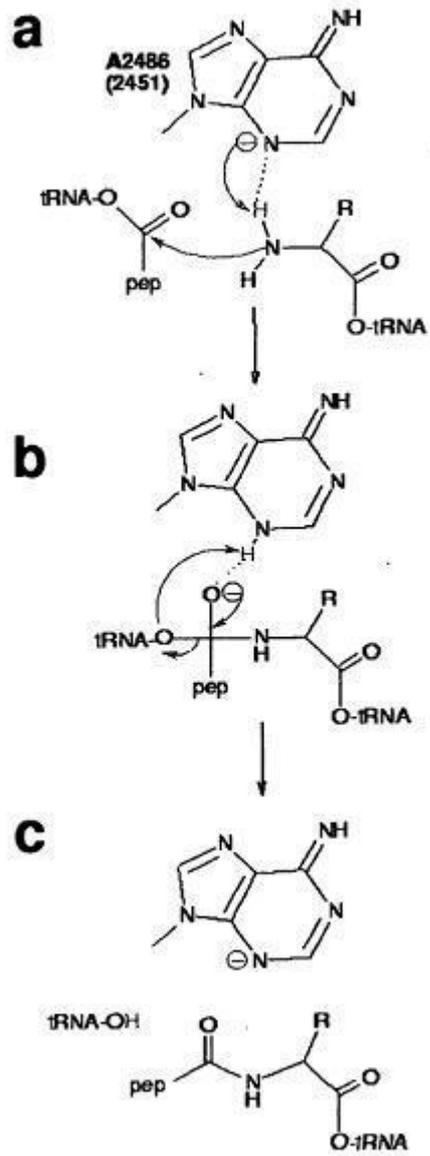
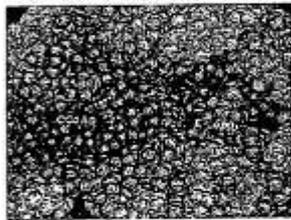


Figura 16

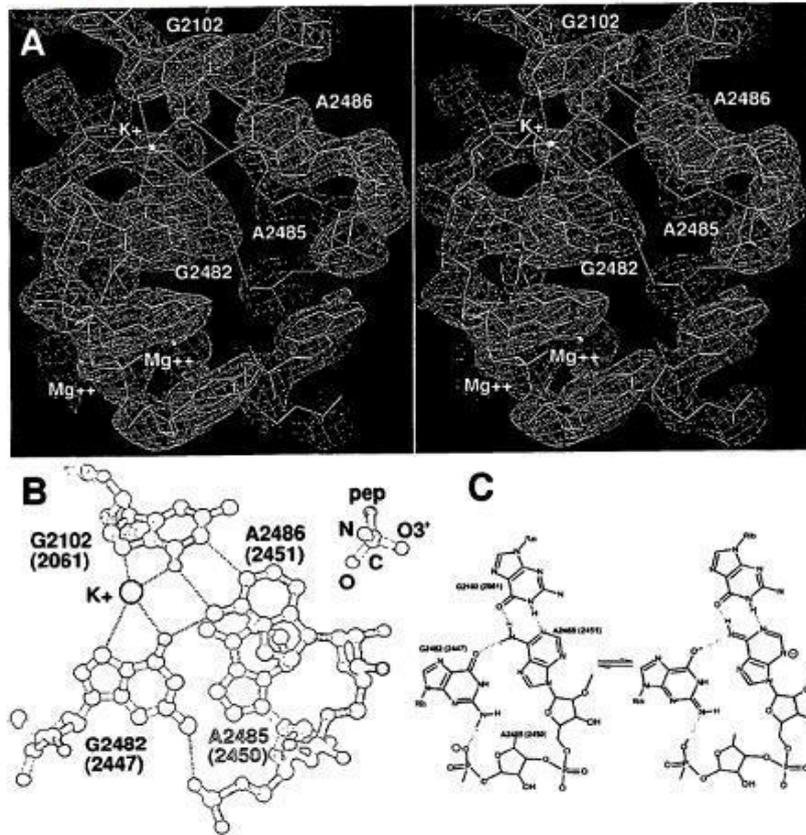
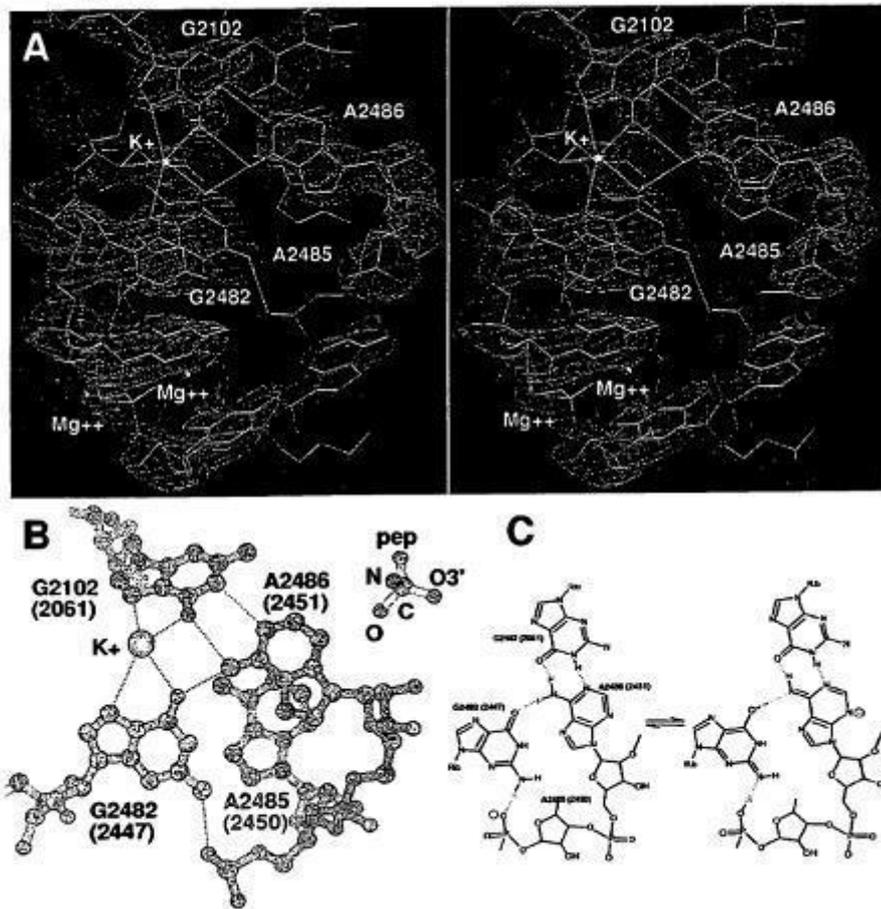


Figura 16'



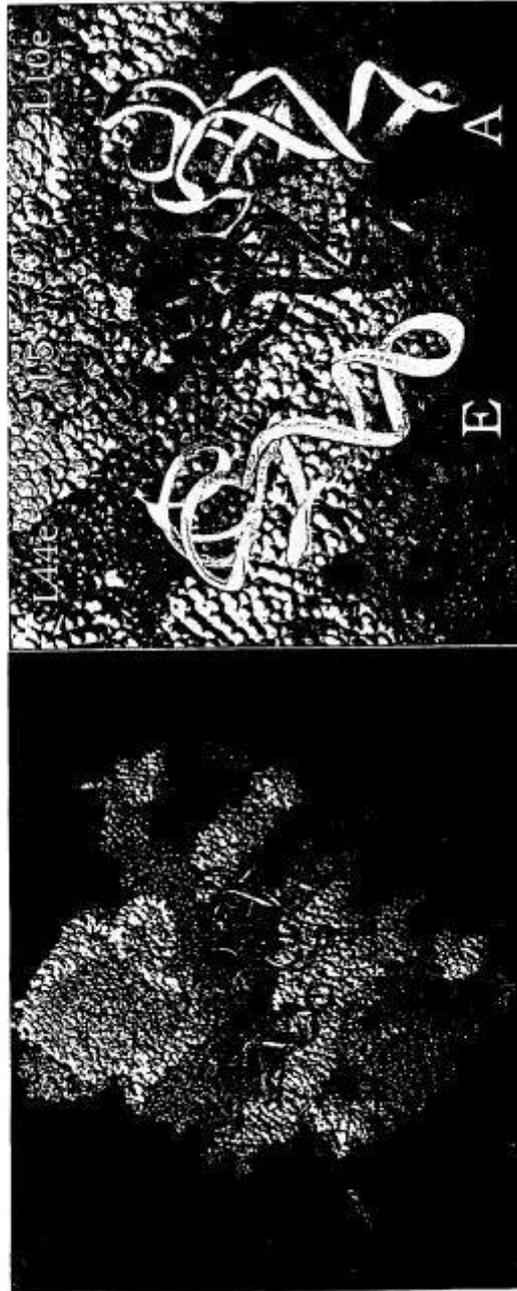


FIG. 18B

FIG. 18A

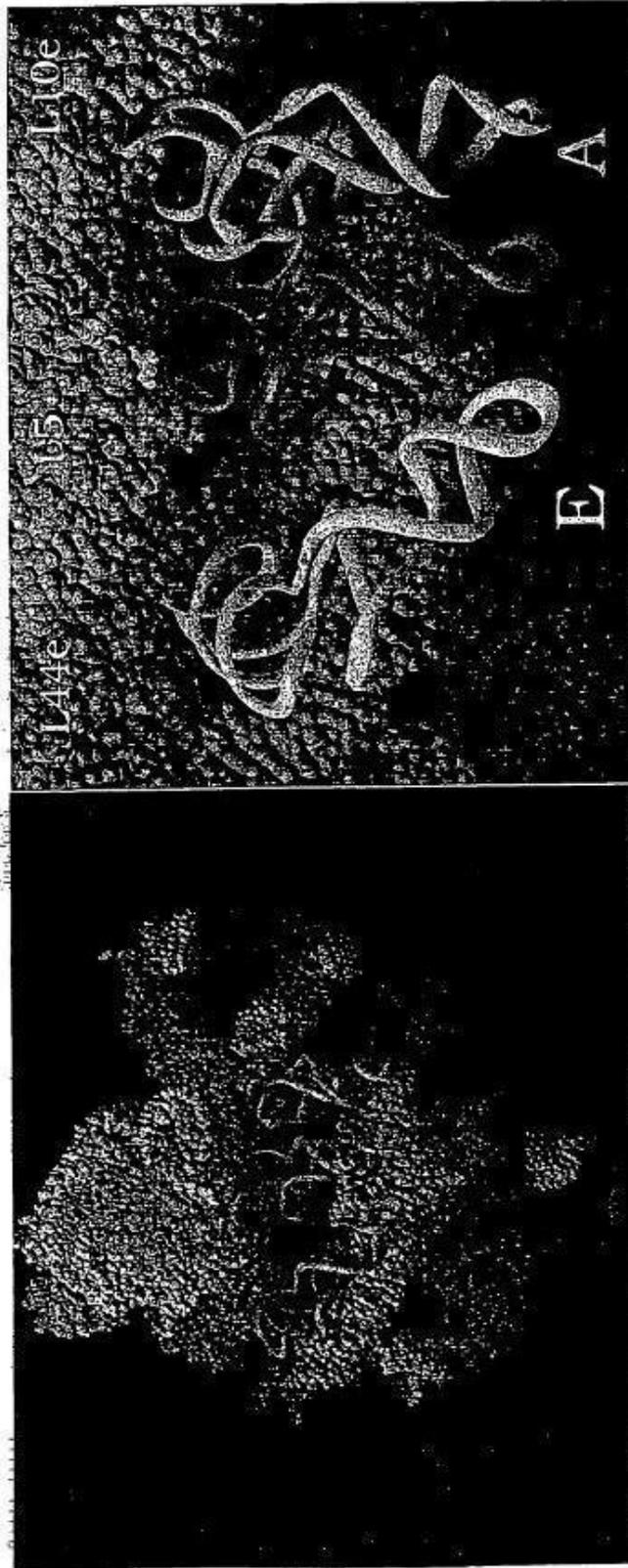


FIG. 18B'

FIG. 18A'

Figura 19

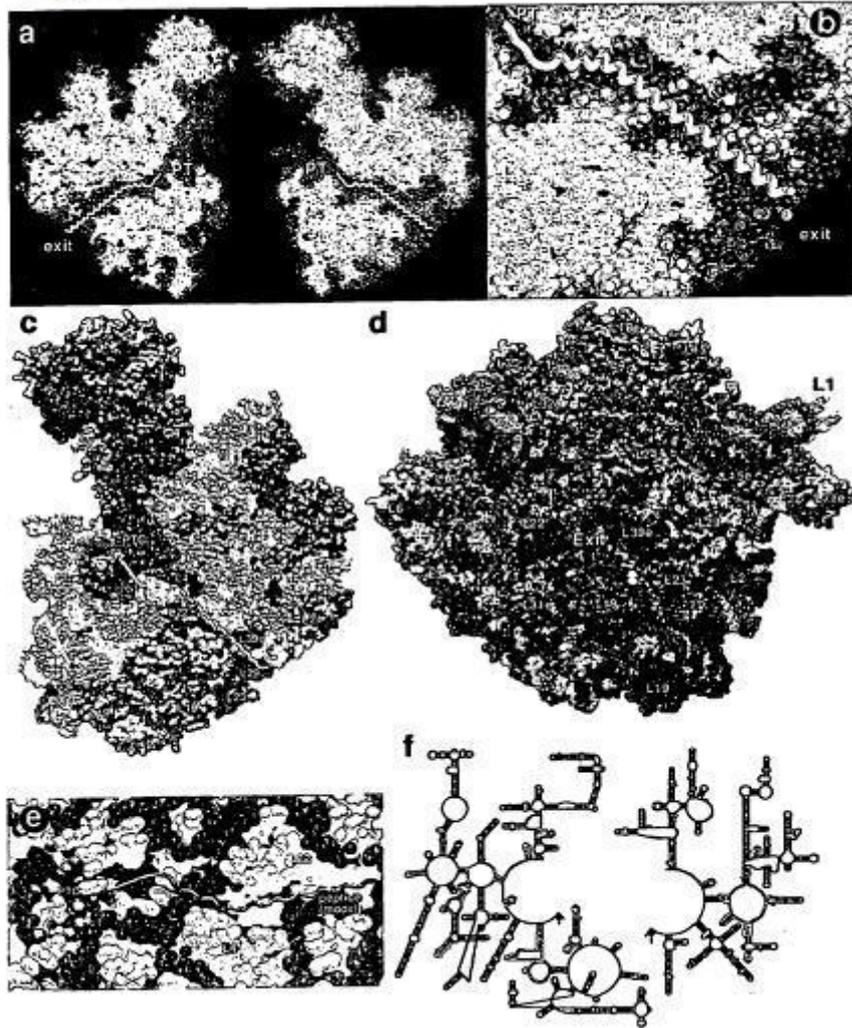
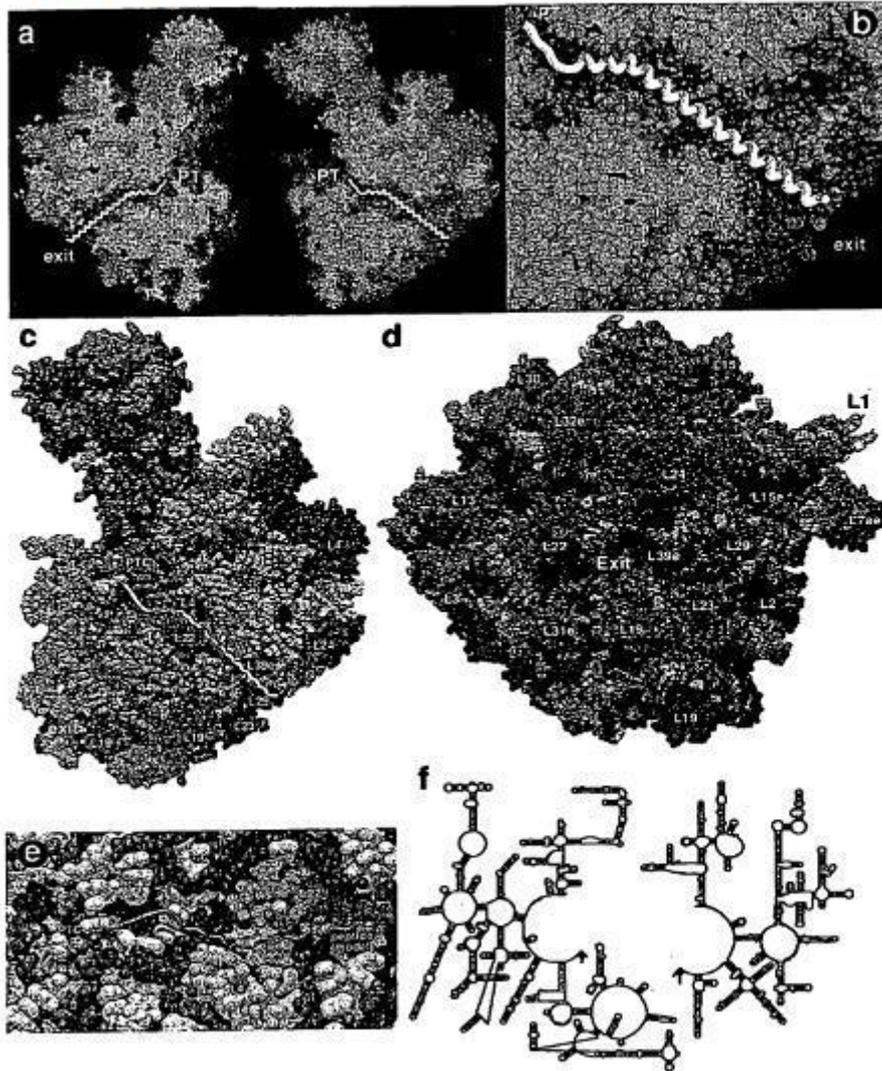


Figura 19'



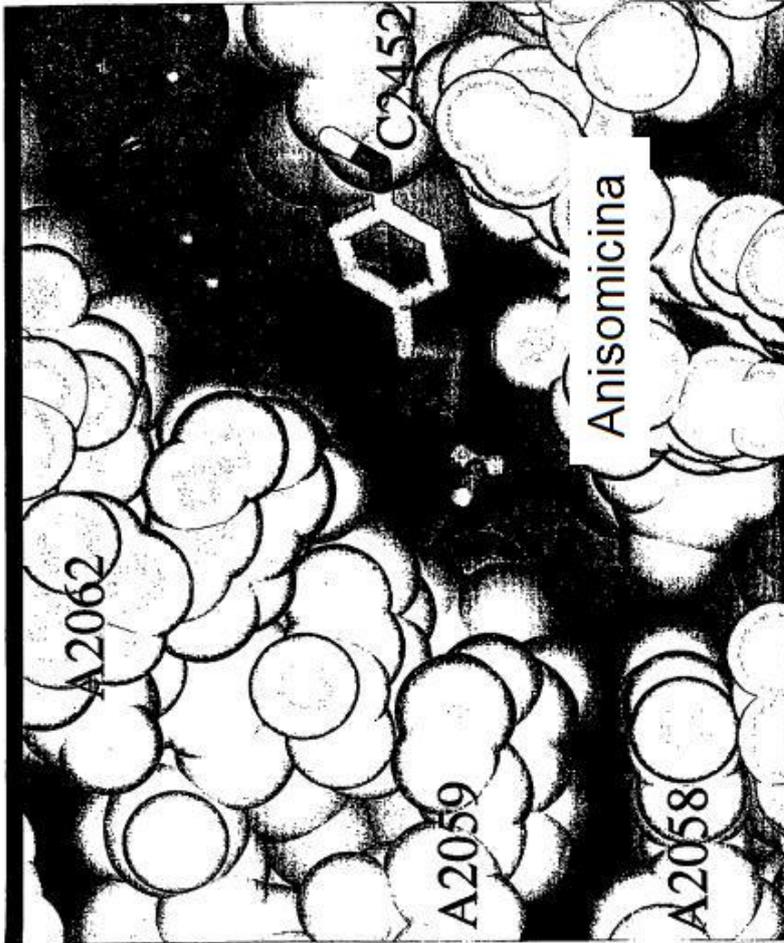


FIG. 20

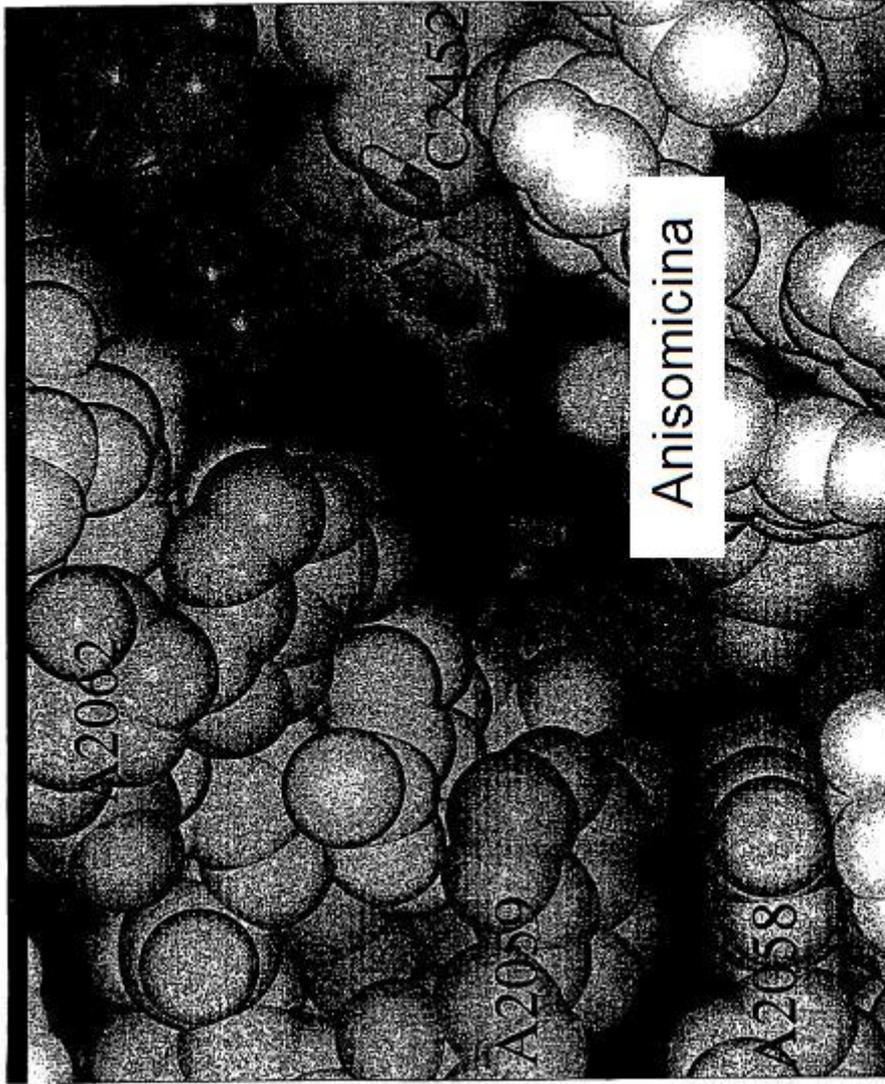


FIG. 20'

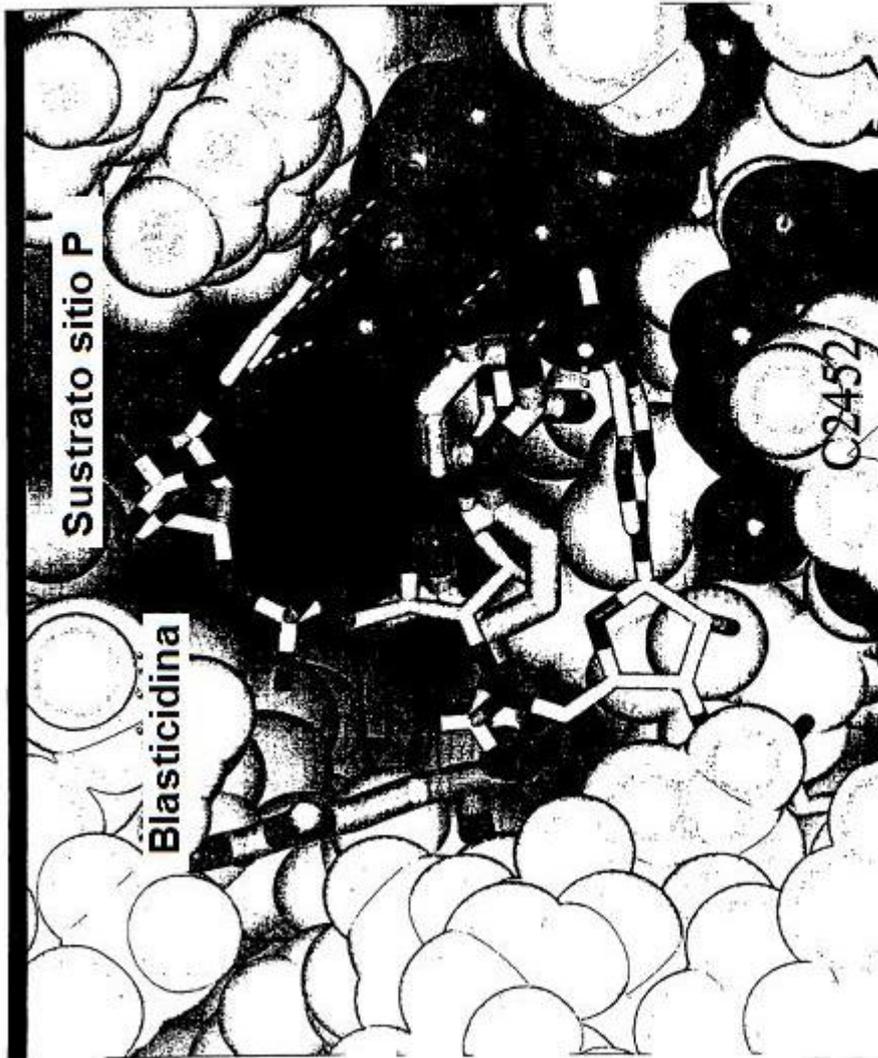


FIG. 21

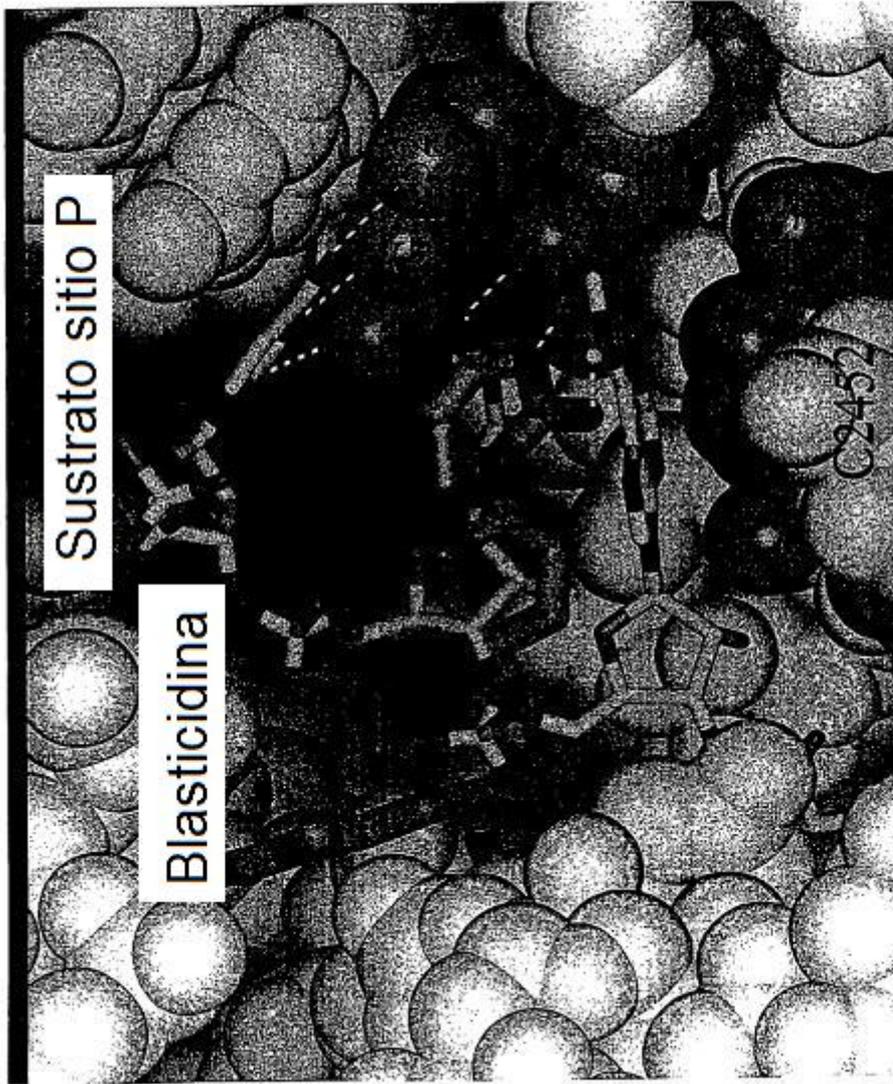


FIG. 21'

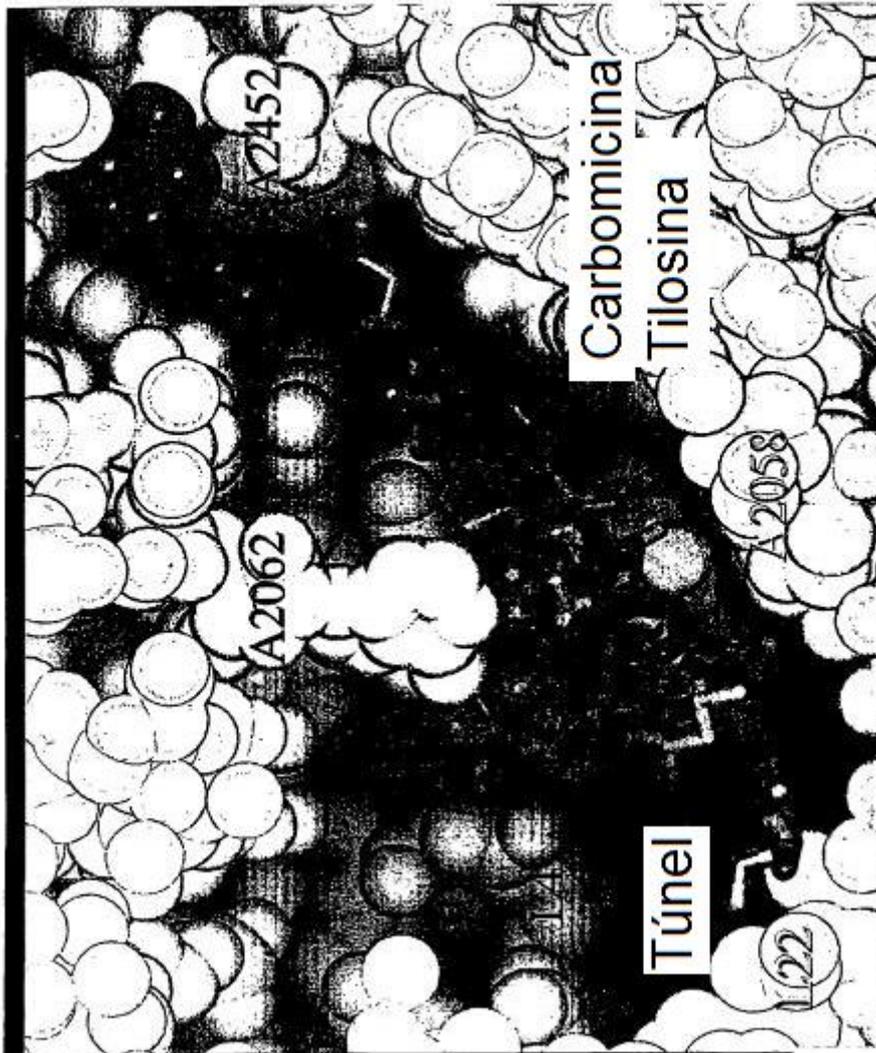


FIG. 22

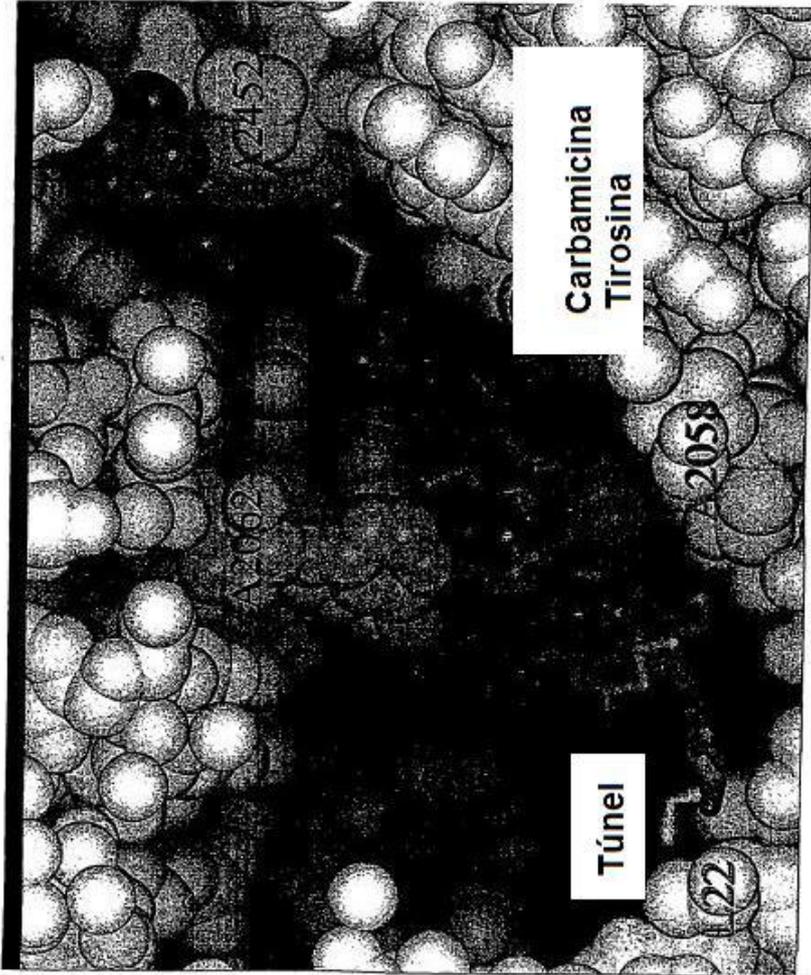


FIG. 22'

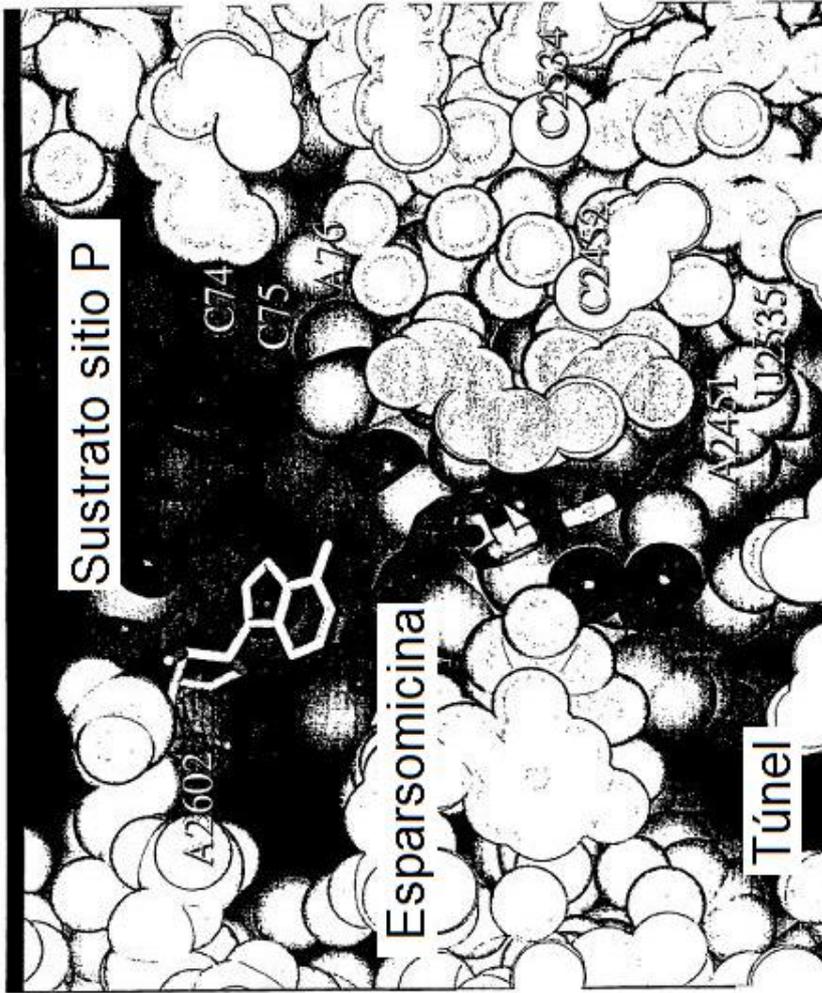


FIG. 23

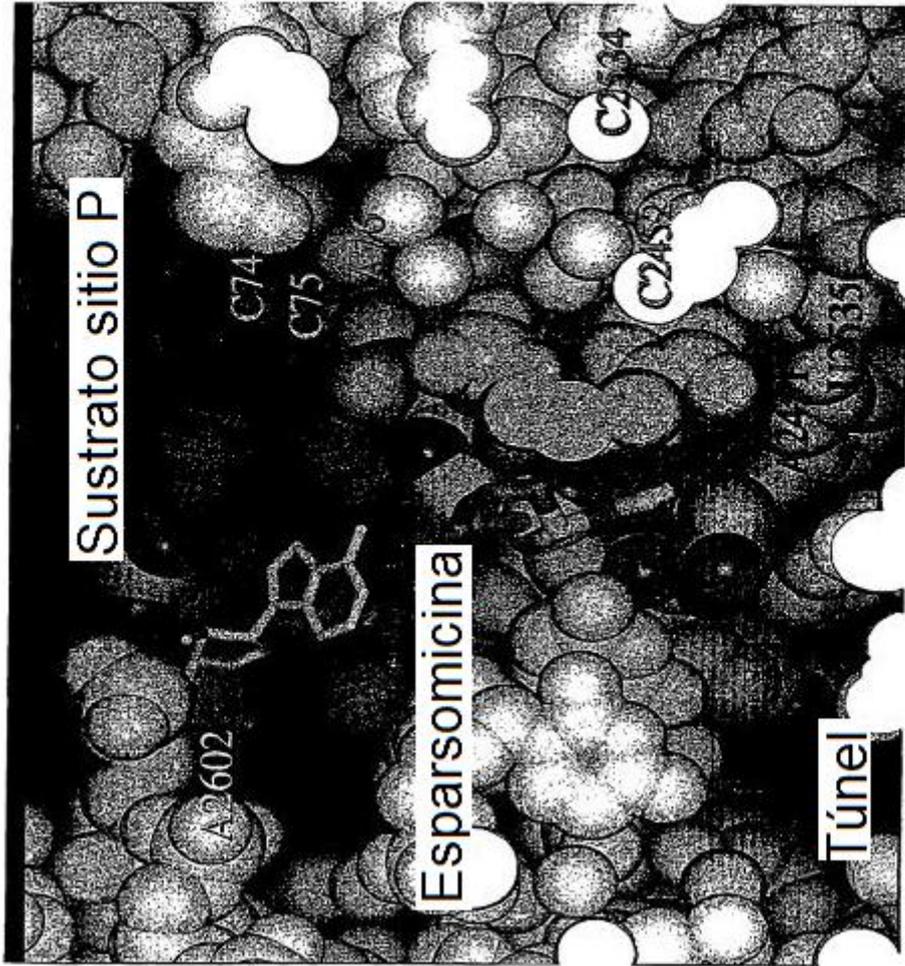


FIG. 23'

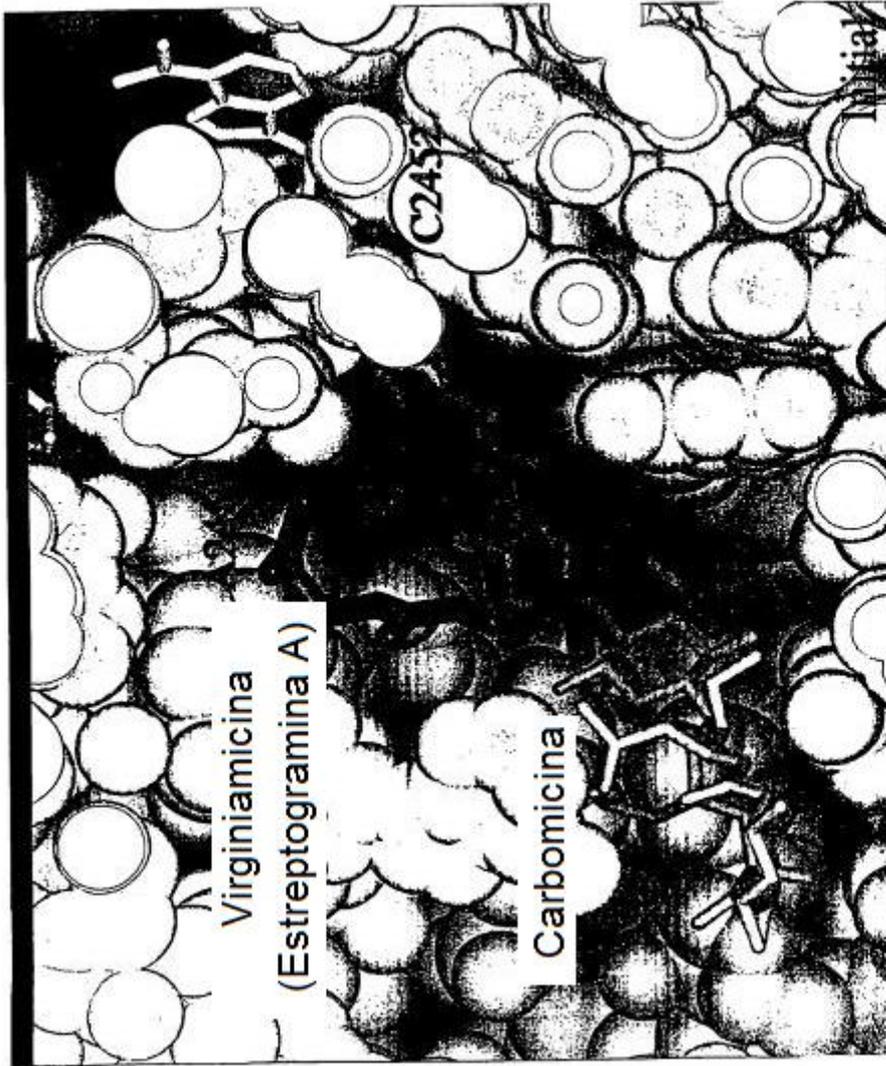


FIG. 24

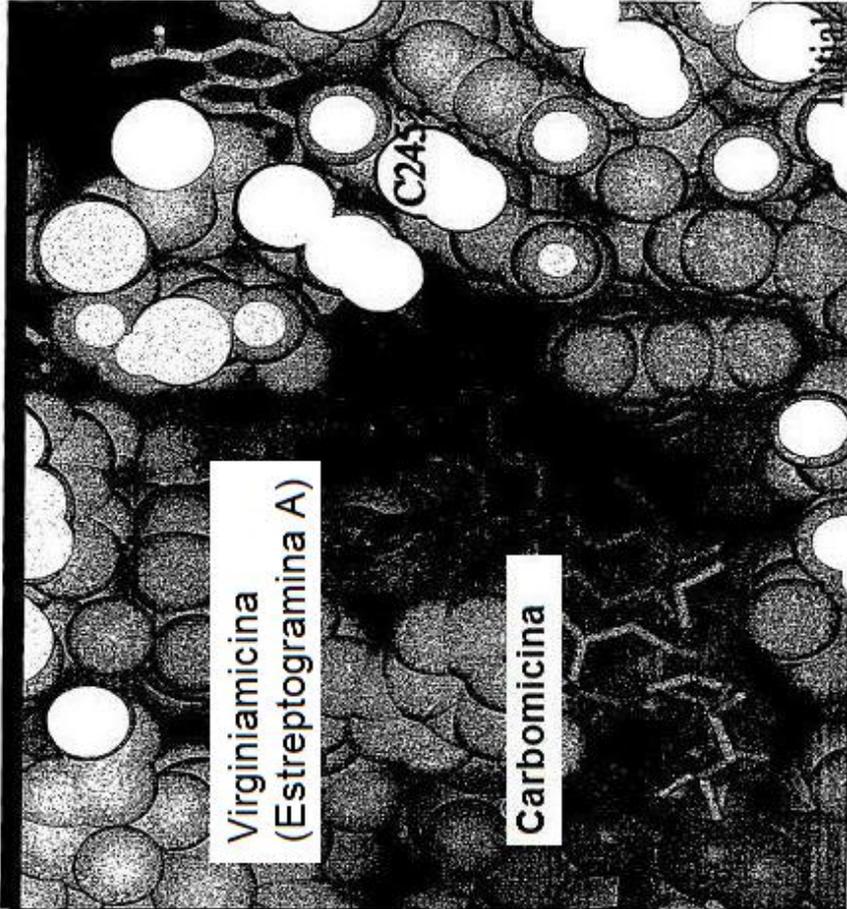


FIG. 24'

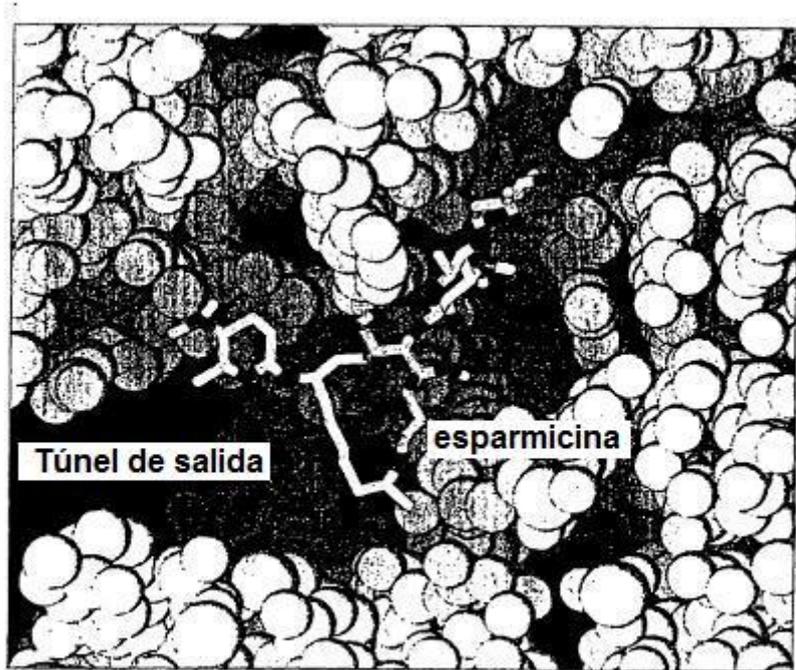


FIG. 25

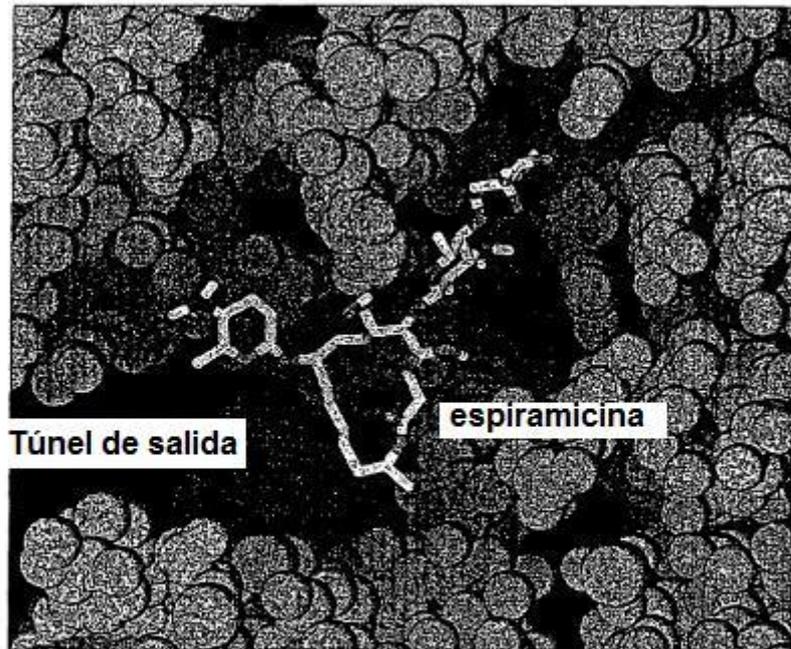


FIG. 25¹

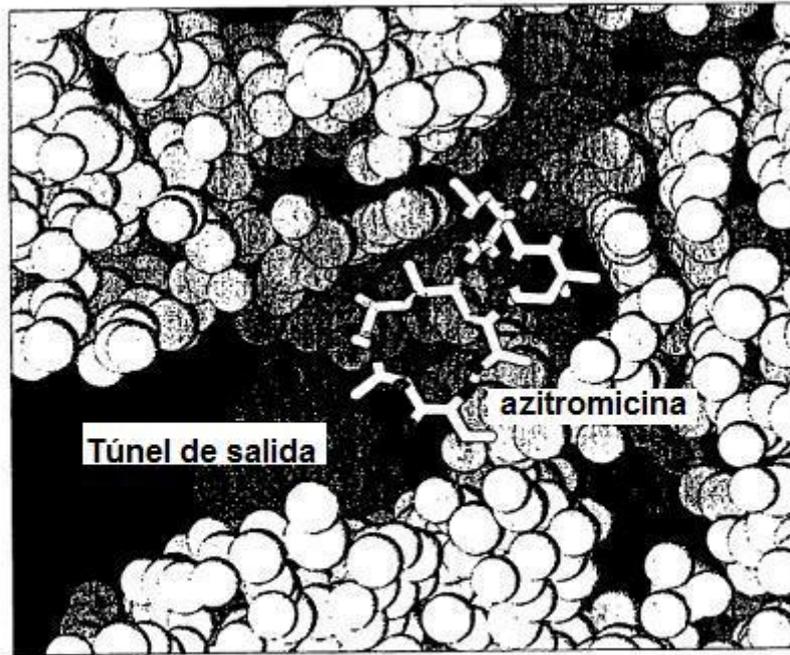


FIG. 26

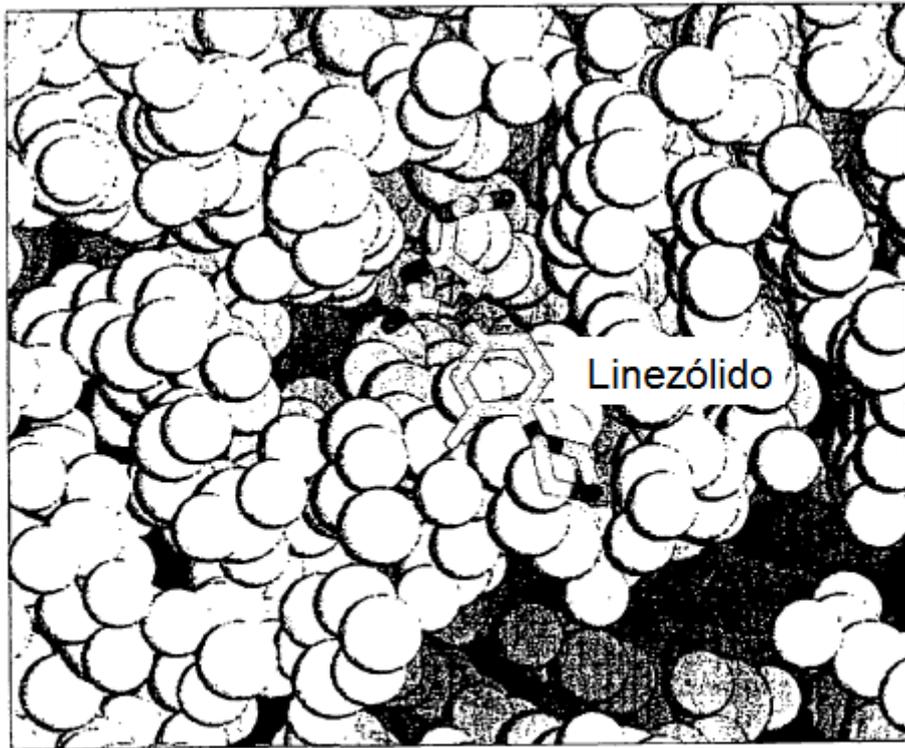


FIG. 27

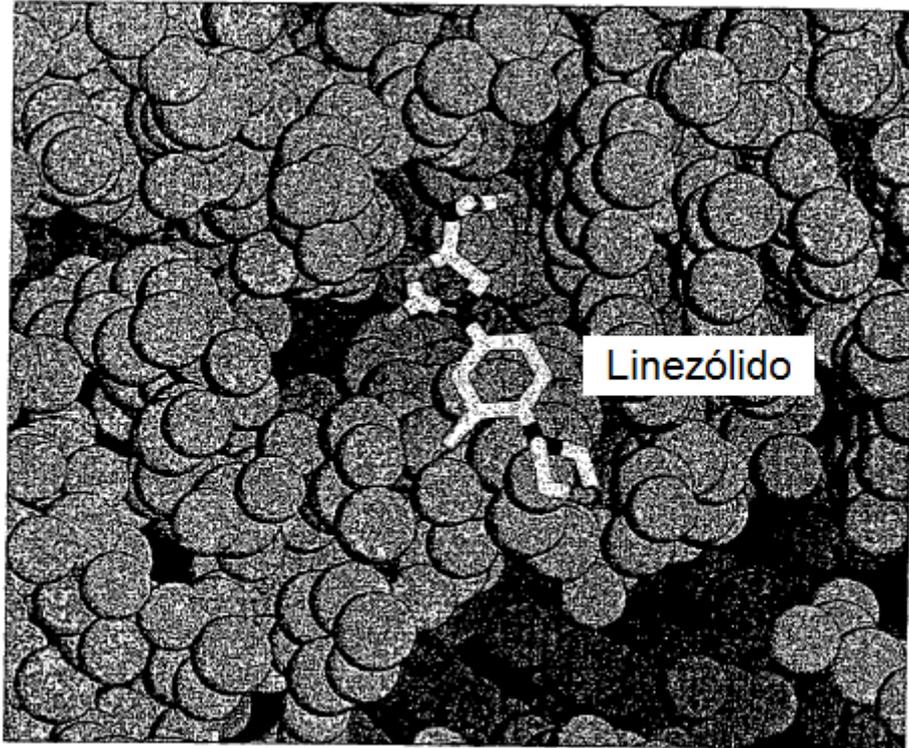


FIG. 27¹

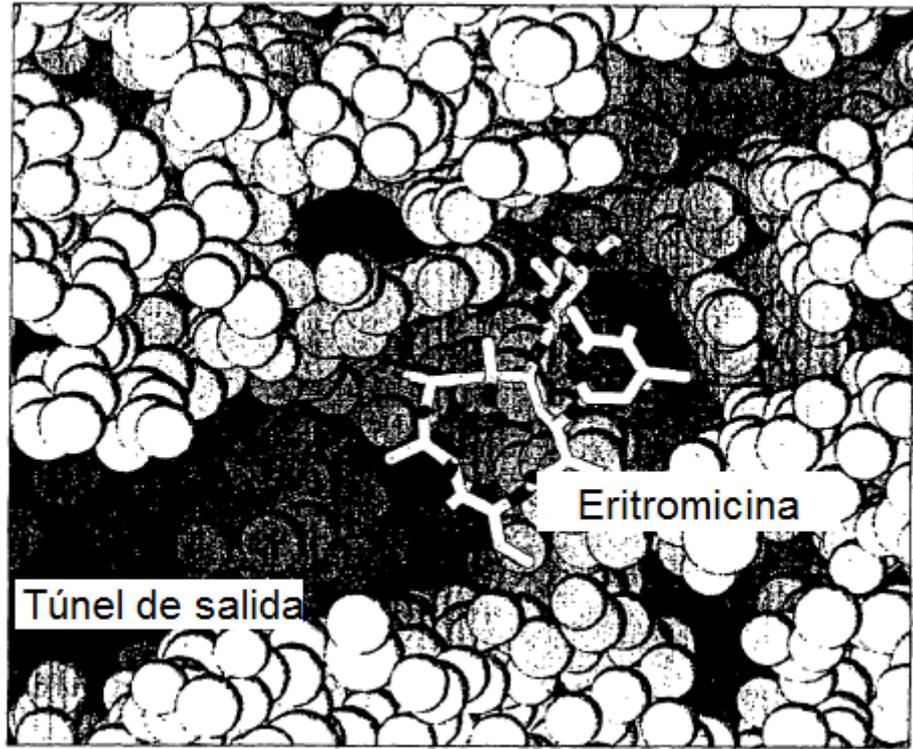


FIG. 28

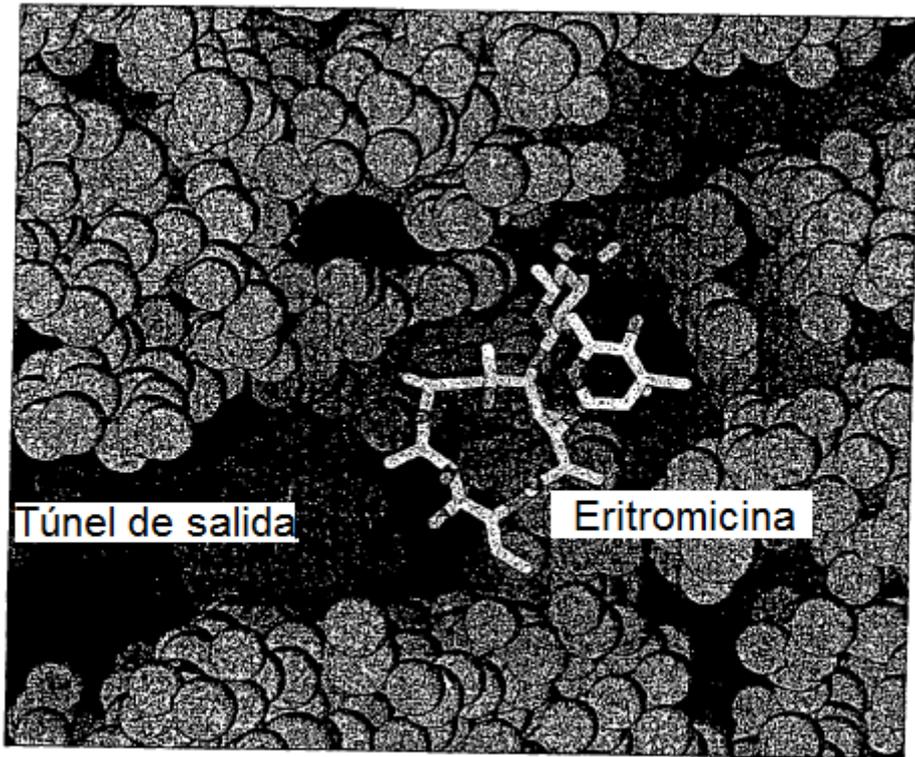


FIG. 28'

Se buscan diversos componentes de PTC

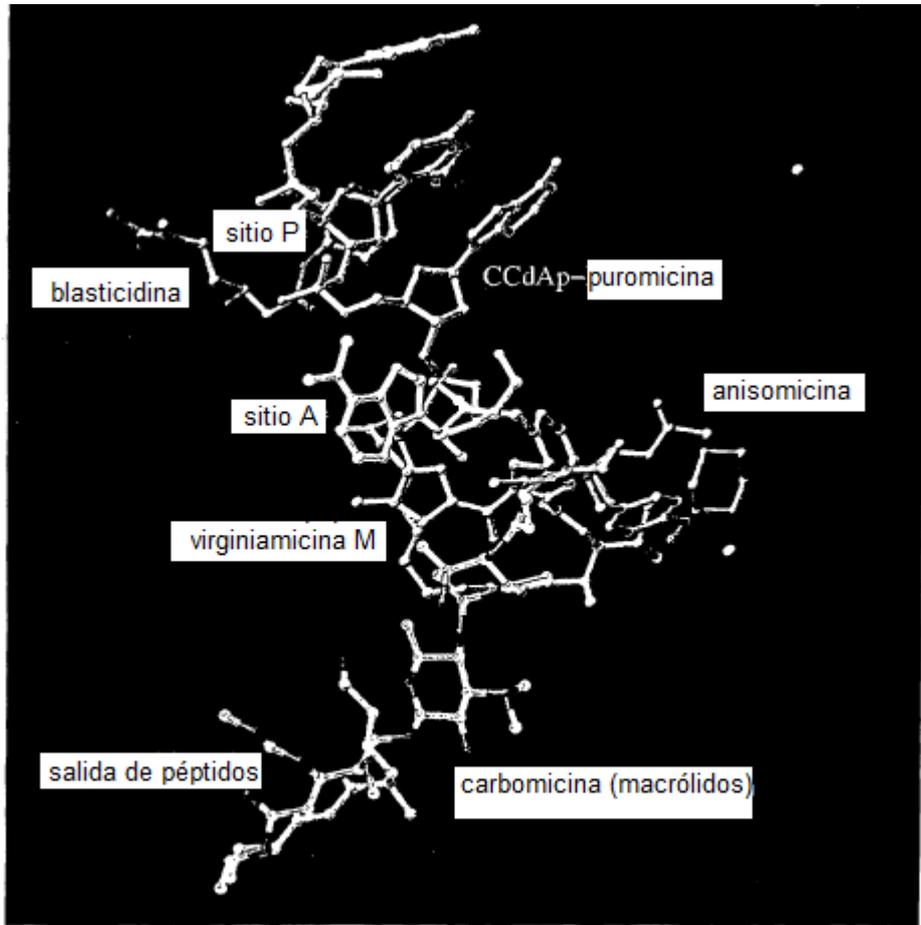


FIG. 29

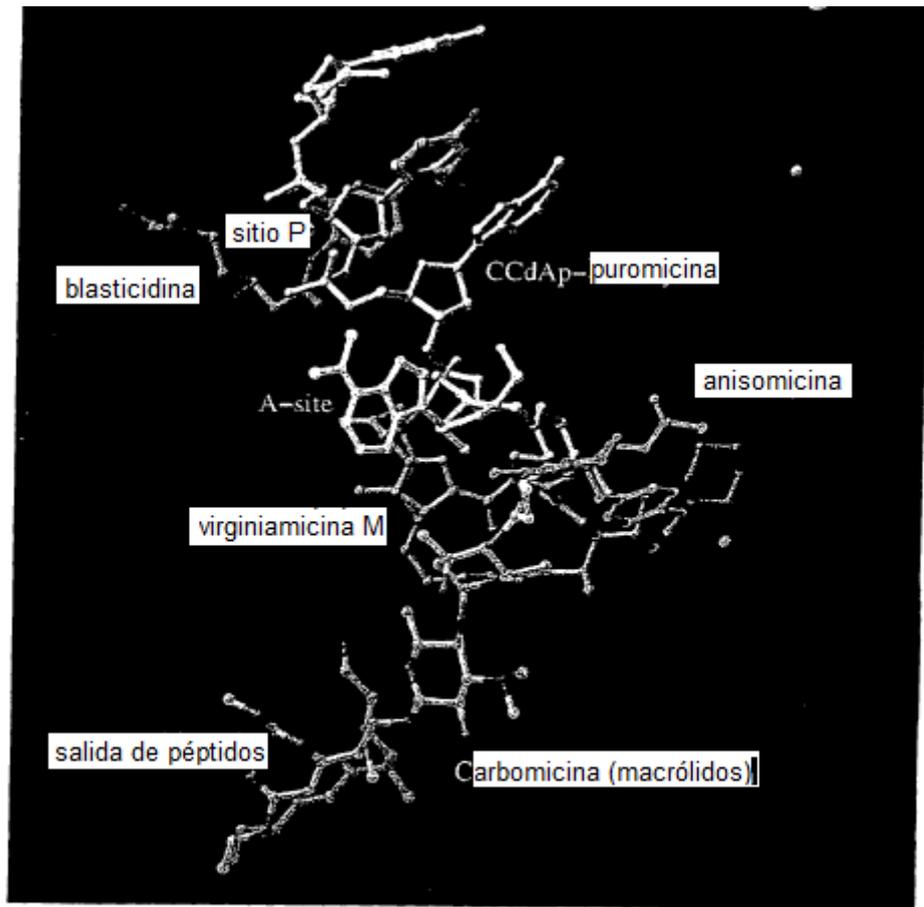
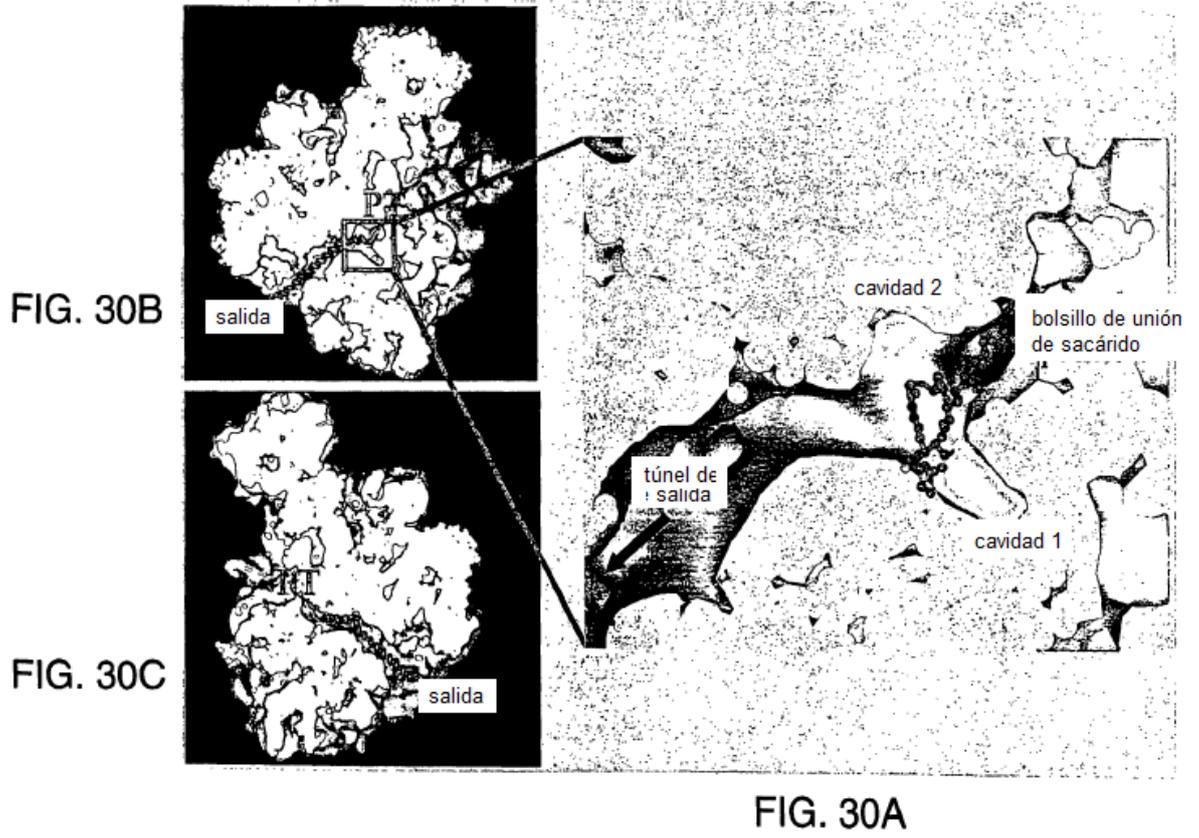
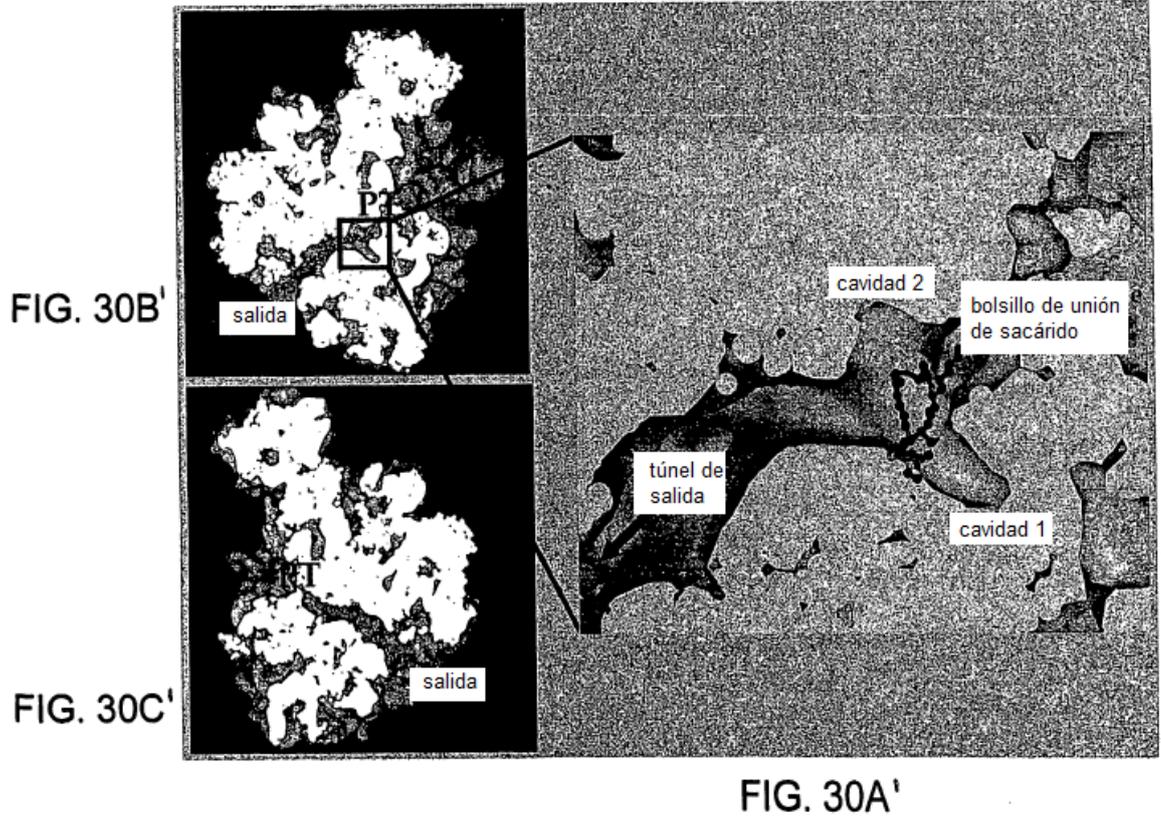


FIG. 29'





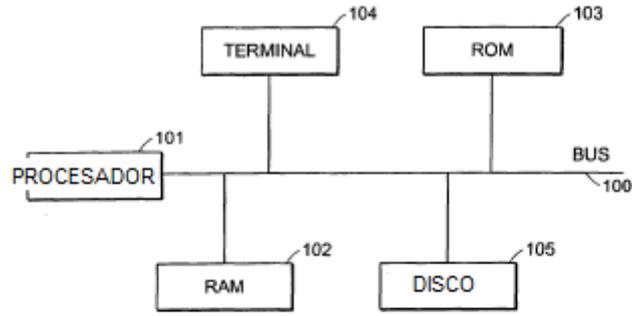


FIG. 31

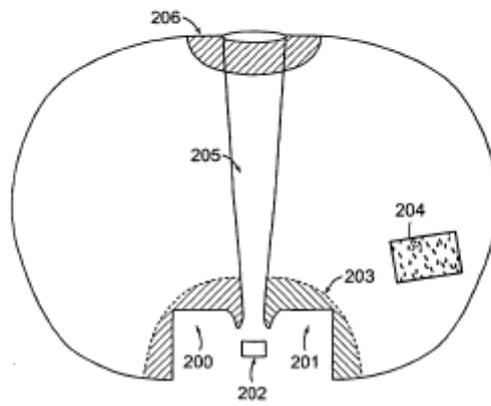
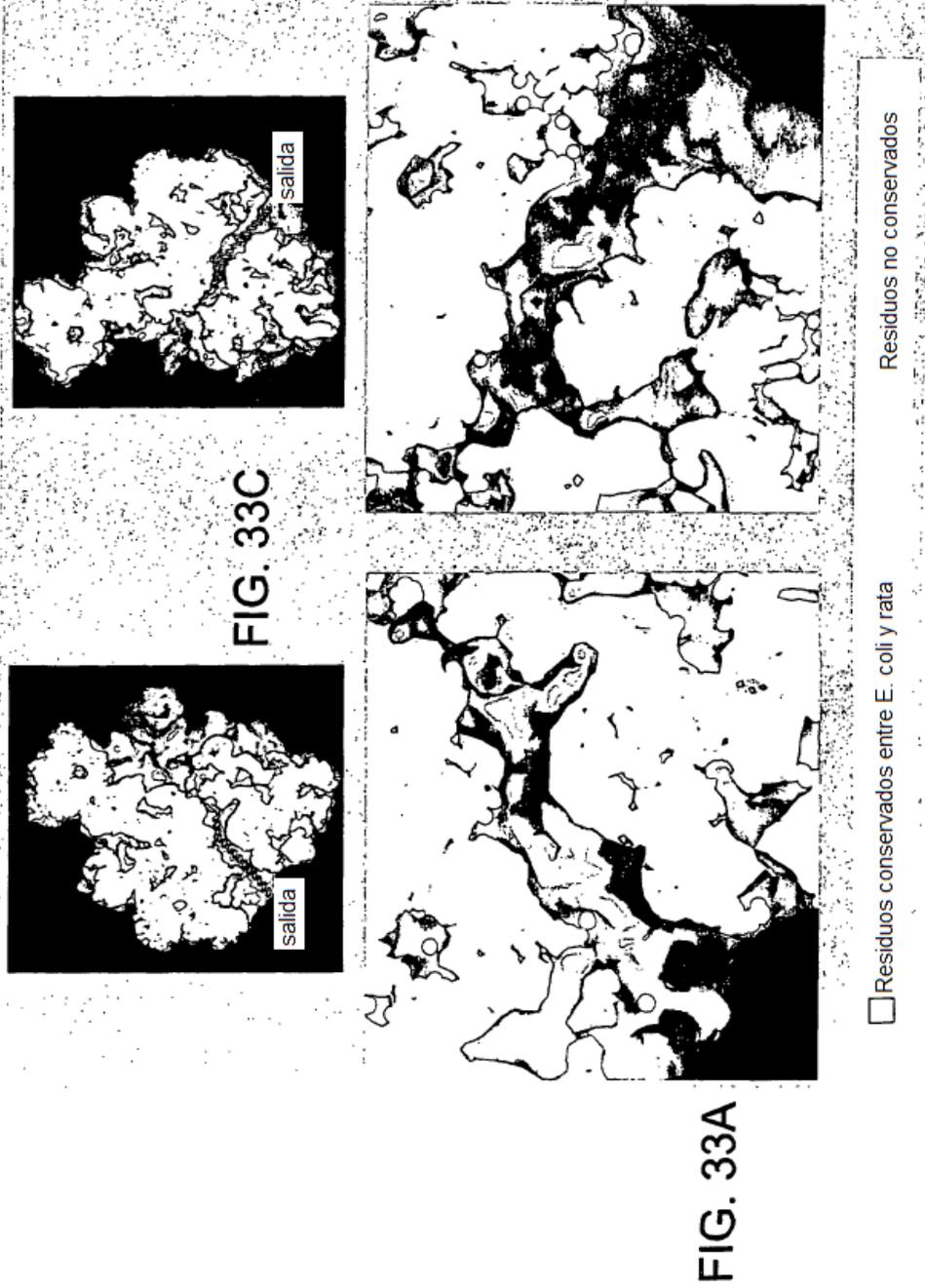
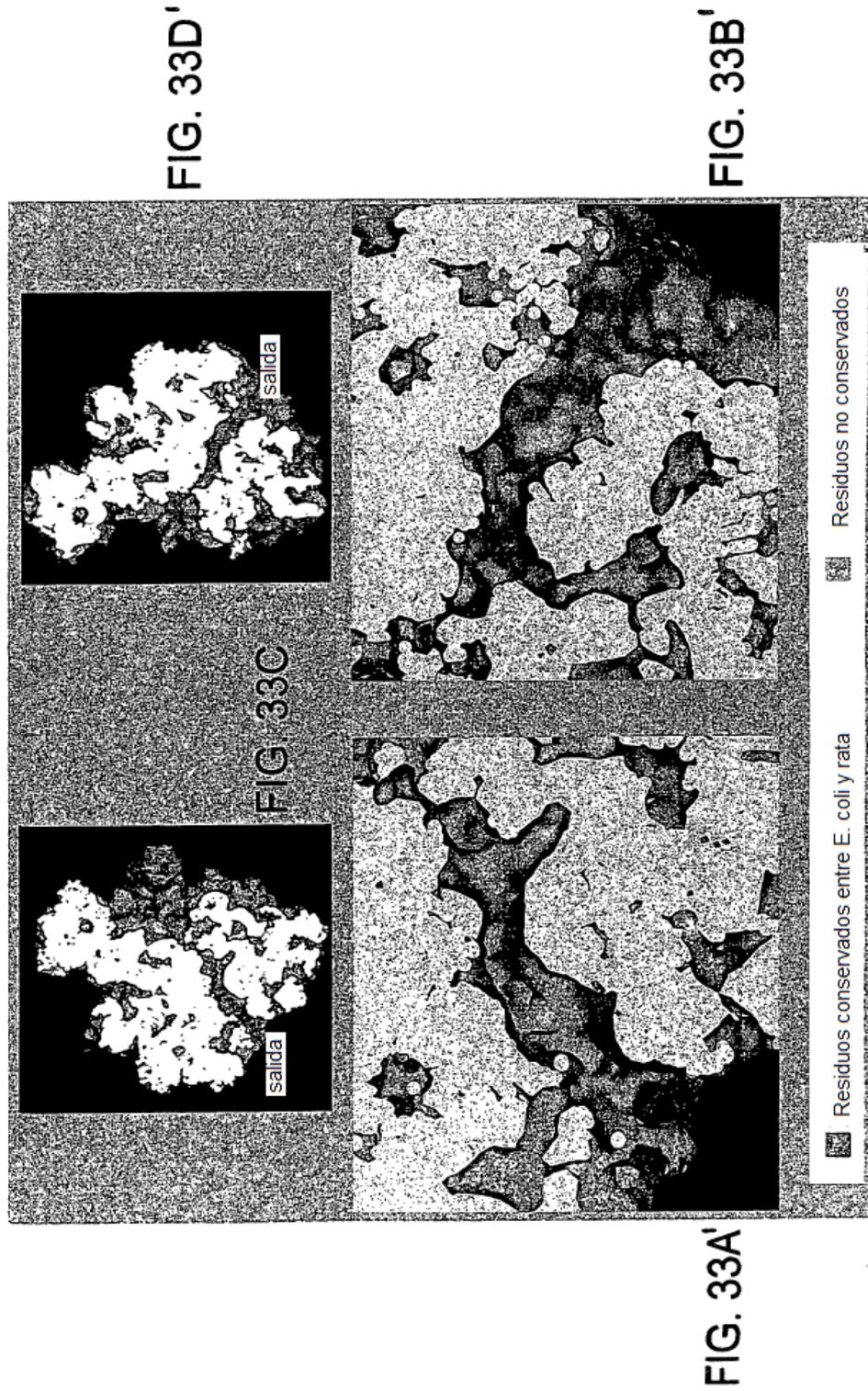


FIG. 32





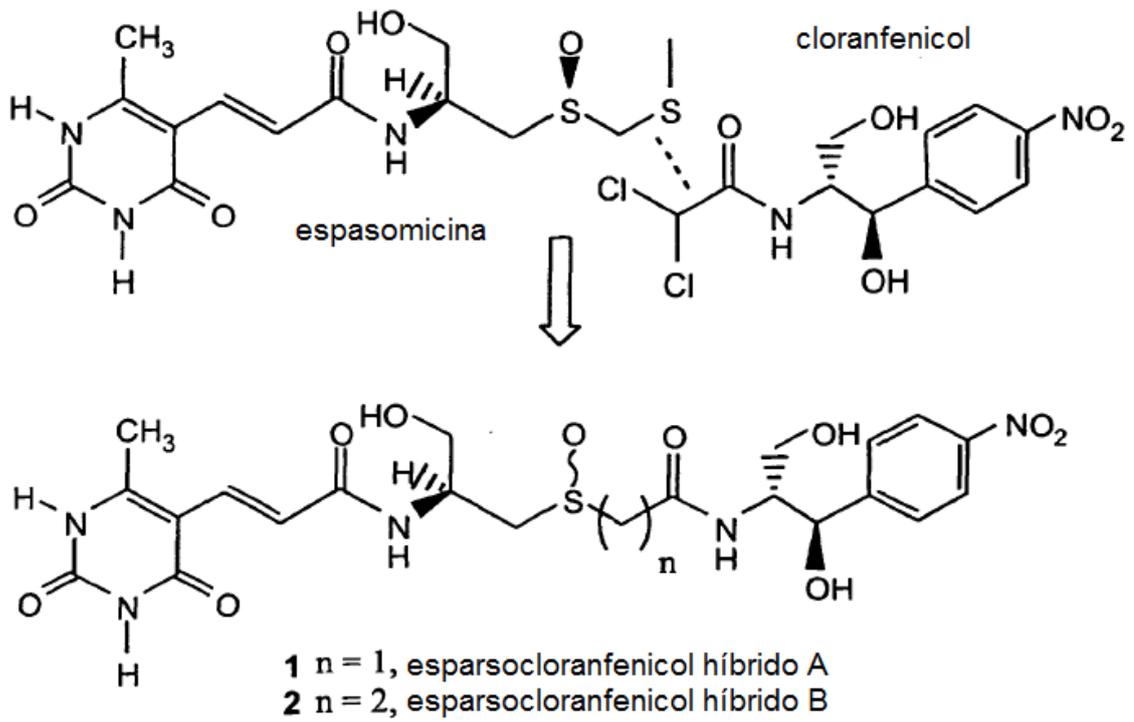


FIG. 34

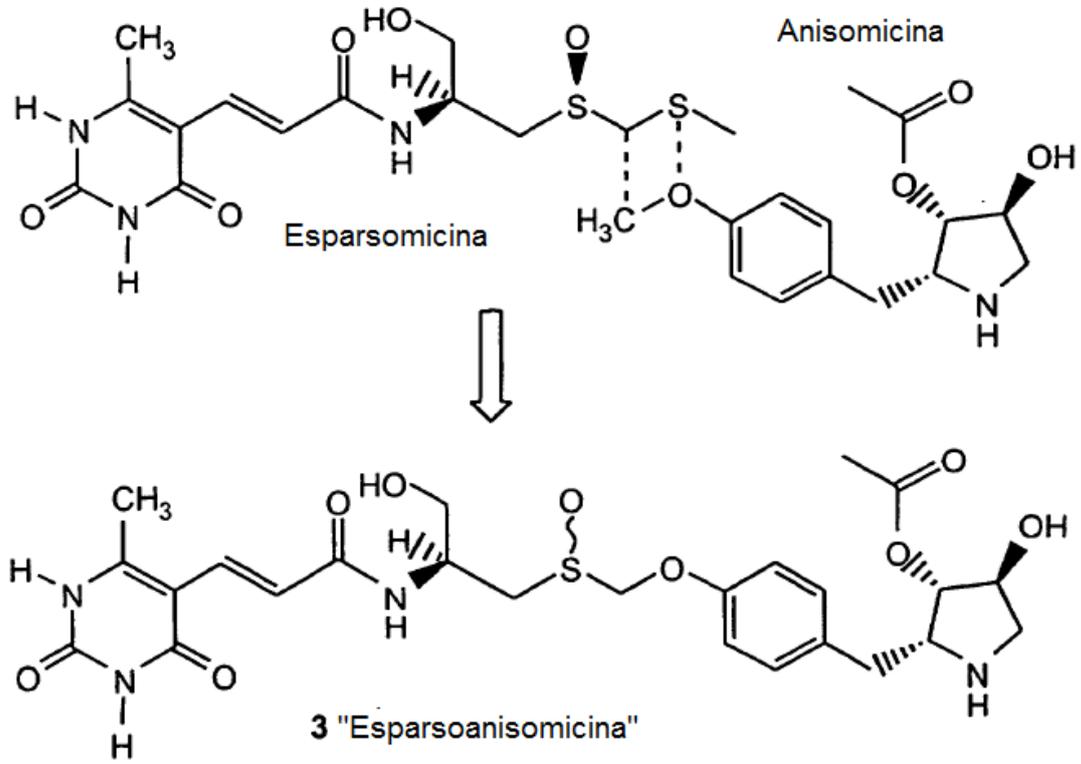


FIG. 35

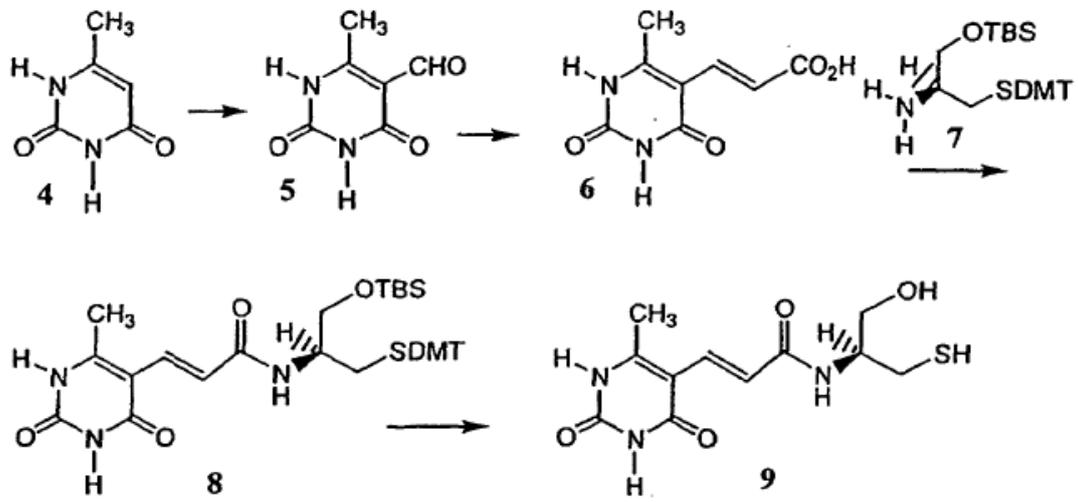


FIG. 36

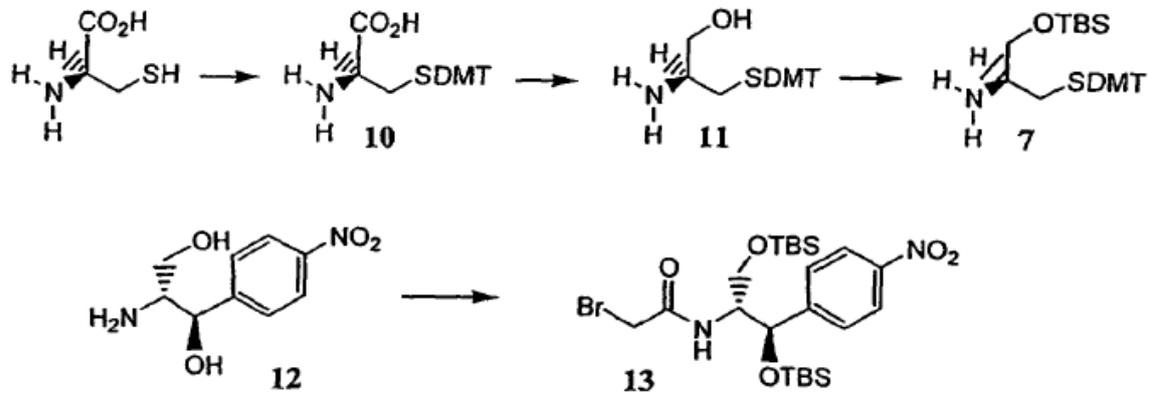


FIG. 37

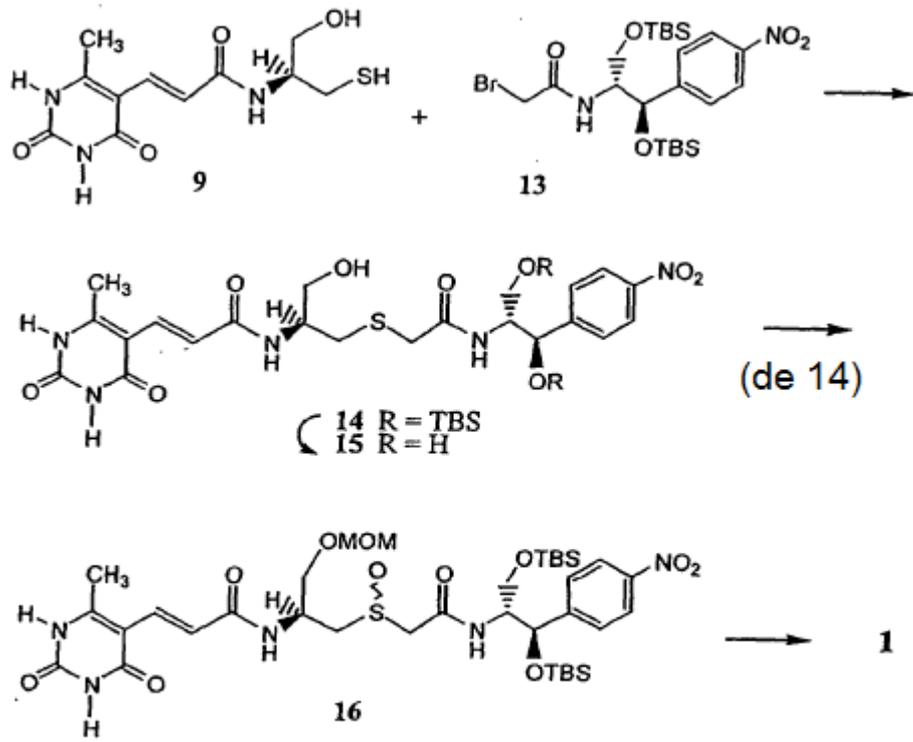


FIG. 38

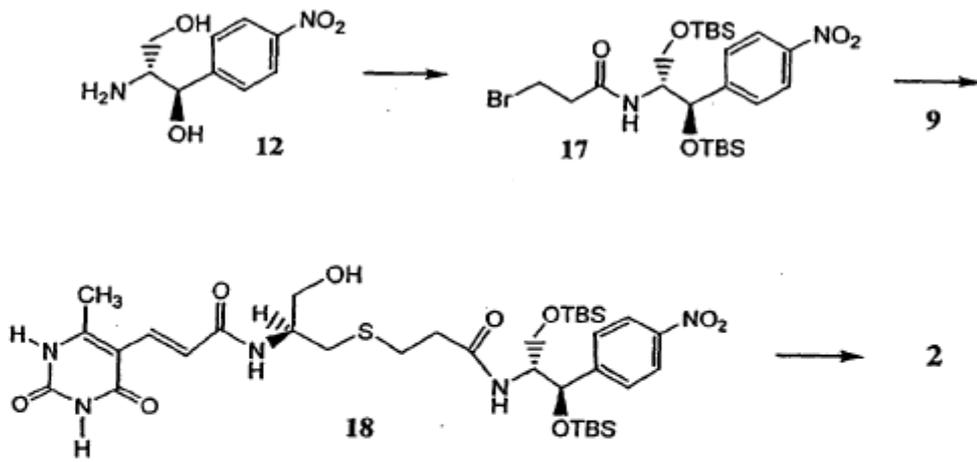


FIG. 39

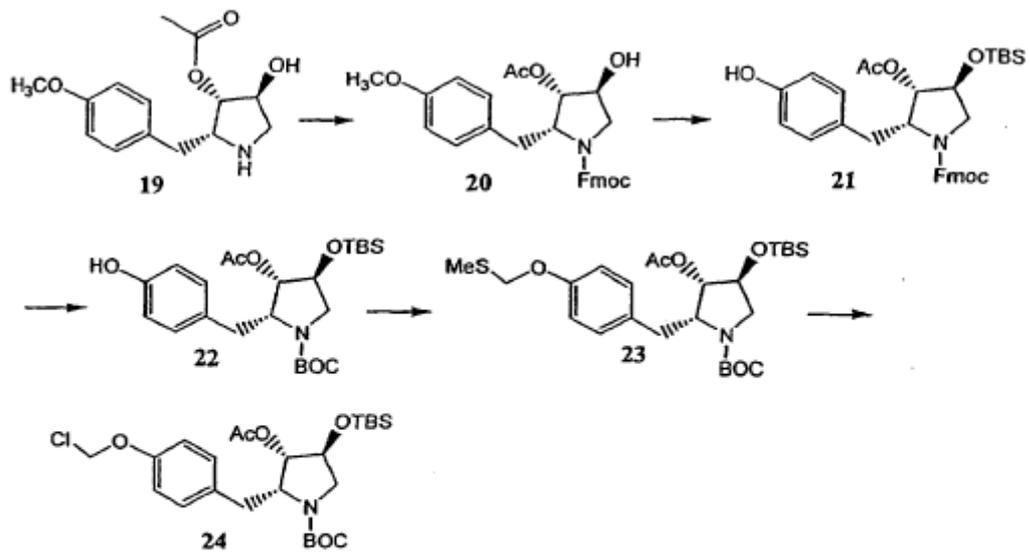


FIG. 40

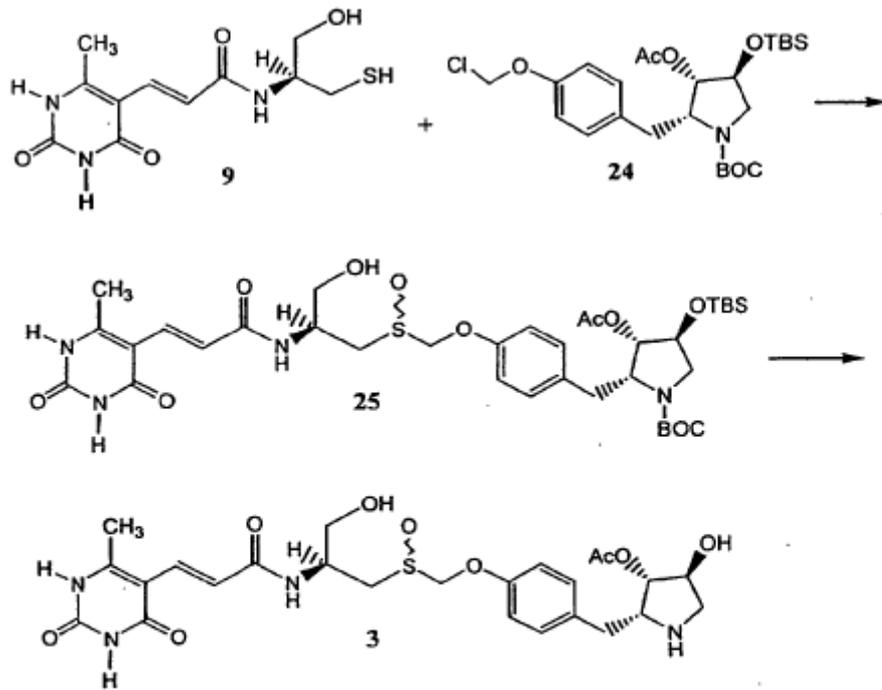


FIG. 41