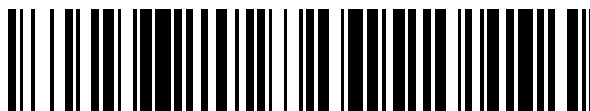


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 420**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/11** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2011 PCT/US2011/059656**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2012 WO12064675**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2011 E 11840569 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2638160**

54 Título: **Nucliones y ribocápsides**

30 Prioridad:

**10.11.2010 US 411974 P**

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

**26.10.2017**

73 Titular/es:

**WYV, Nigel L. (100.0%)  
1101 Green Valley Road  
Bryn Mawr, PA 19010, US**

72 Inventor/es:

**WEBB, NIGEL L. y  
GAMPER, HOWARD, B.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 639 420 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

Nucliones y ribocápsides

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento de que ciertos ácidos ribonucleicos naturales forman una cáscara polimérica, llamada una ribocápside, alrededor de otro ácido nucleico, que forma una estructura biológica llamada un nuclión. Las moléculas de ARN de transferencia ('ARNt') forman tales nucliones cuando se unen entre sí y el ARN mensajero ('ARNm') sin la participación de un ribosoma. Estos nucliones de ARNt limitan y protegen el ARNm, marcan codones de iniciación de la traducción, garantizan el registro del marco, almacenan ARNt cargados y aceleran la síntesis de proteínas. Nucliones y ribocápsides anormales puede producir varias enfermedades y trastornos humanos. Por ejemplo, mutaciones en los sitios de ARNt que se unen a ARNt adyacentes en una ribocápside están asociadas a transformaciones celulares implicadas en ciertos tipos de cáncer. Retrovirus tales como el VIH forman estructuras de cebador de ARNt que imitan a los nucliones legales, supuestamente para apropiarse de la maquinaria de síntesis de proteínas de células hospedadoras.

Las industrias farmacéuticas y de biotecnología están en necesidad urgente de nuevas dianas biológicas para el desarrollo de novedosos productos de diagnóstico, terapéuticos y profilácticos para el tratamiento de enfermedades y trastornos humanos. La presente divulgación trata directamente esta necesidad, proporcionando nucliones aislados para su uso en investigación farmacéutica y desarrollo. Los nucliones desempeñan una función clave en todas las síntesis de proteínas en seres humanos, y, como tales, representan candidatos excelentes para la intervención médica. En el presente documento se describen dianas de nuclión específicas para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por nucliones, que incluyen, pero no se limitan a, ciertos cánceres e infecciones virales. También se describen en el presente documento métodos para la fabricación de nucliones aislados para su uso por los investigadores y otros en las industrias farmacéuticas y de biotecnología.

30 Sumario de la invención

La presente descripción se refiere a un nuclión aislado que comprende (i) un ácido nucleico de núcleo, y (ii) una o más ribocápsides que comprenden cada una un polímero de dos o más subunidades de ribocápside, en el que dichas subunidades de ribocápside comprenden ácido nucleico.

35 Por consiguiente, la presente invención proporciona un nuclión aislado que comprende (i) un ácido nucleico de núcleo, y (ii) una o más ribocápsides que comprenden cada una un polímero de dos o más subunidades de ribocápside, en el que

40 (a) el ácido nucleico de núcleo comprende, como una porción o totalidad de su estructura, una región con sitios de unión múltiples con los que se unen a subunidades de ribocápside;

(b) las subunidades de ribocápside comprenden cada una ácido nucleico y al menos un sitio de unión con el que se unen a un sitio de unión en el ácido nucleico de núcleo; y

45 (c) la mayoría o la totalidad de las subunidades de ribocápside comprenden al menos un sitio de unión con el que se unen a un sitio de unión en una subunidad de ribocápside adyacente, unida por el mismo ácido nucleico de núcleo.

50 En realizaciones adicionales, (a) la mayoría o la totalidad de las subunidades de ribocápside están unidas a al menos una parte del ácido nucleico de núcleo, y (b) la mayoría o la totalidad de las subunidades de ribocápside están unidas a al menos una parte de una o más subunidades de ribocápside adyacentes.

55 En realizaciones adicionales, dicho nuclión comprende además una o más envueltas de nuclión, en la que cada envuelta de nuclión es una composición que comprende (i) una envuelta, cáscara, cierre, capa, película, superficie, envoltura, recubrimiento, camisa, protección, revestimiento, cubierta, tratamiento, encapsulación, una combinación de cualesquiera dos o más de los anteriores, o un híbrido de cualesquiera dos o más de los anteriores, y (ii) un medio de unión de dicha composición a la totalidad, una parte o partes de un nuclión sin una envuelta de nuclión.

60 En realizaciones adicionales, al menos una de las envueltas de nuclión está unida a al menos una parte de (a) la parte de nuclión básico del nuclión, (b) un ácido nucleico de núcleo, (c) una o más de las ribocápsides, (d) una o más de las subunidades de ribocápside, (e) otra envuelta de nuclión del nuclión, o (f) cualquier combinación de los anteriores.

65 En aún realizaciones adicionales, una o más de las subunidades de ribocápside comprenden ARN, por ejemplo, ARN de transferencia. En realizaciones adicionales, una o más de las subunidades de ribocápside comprenden ARN de transferencia iniciador y una o más de las subunidades de ribocápside comprenden ARN de transferencia

elongador. El nuclión puede ser un mimético o falsificación de un nuclión normal, y dicho nuclión puede ser una composición similar a nuclión asociada a un organismo celular, un agente accidental, un virus, un retrovirus, un complejo de cebador de ARNt retroviral, un complejo de cebador de ARNt del virus de la inmunodeficiencia humana, cualquier otra fuente natural de un mimético de nuclión o cualquier fuente no natural de un mimético de nuclión.

5 En un aspecto, el ácido nucleico de núcleo comprende ADN. En otro aspecto, el ácido nucleico de núcleo comprende ARN, por ejemplo, ARN mensajero. En otro aspecto, una o más subunidades de ribocápside están unidas a dicho ARNm en o cerca de un codón de iniciación. En otro aspecto, una o más subunidades de ribocápside están además unidas a una parte de una secuencia de marcador de síntesis de proteínas en dicho ARNm, en el que  
10 tal secuencia de marcador es opcionalmente una secuencia de Shine-Dalgarno o una secuencia de Kozak. En otro aspecto, uno o más componentes de nuclión del nuclión, tales como ARNm, se unen además a al menos una parte de un ribosoma. En otro aspecto, el nuclión aislado es un nuclión de iniciación, en el que (i) el ácido nucleico de núcleo comprende ARNm y (ii) al menos una parte de dicho ARNm comprende una ribocápside y/o secuencia de unión de subunidad de ribocápside operativamente unida al codón de iniciación en dicho ARNm.

15 La invención también se refiere a un método para la fabricación de un nuclión aislado poniendo en asociación entre sí dos o más componentes de nuclión. En un aspecto, el nuclión se fabrica poniendo en asociación una combinación de componentes de nuclión, en el que tal combinación está seleccionada del grupo que consiste en (i) un ácido nucleico de núcleo y dos o más subunidades de ribocápside, (ii) un ácido nucleico de núcleo, dos o más  
20 subunidades de ribocápside, y una o más envueltas de nuclión predefinidas, (iii) un nuclión básico y una o más envueltas de nuclión predefinidas, (iv) un ácido nucleico de núcleo y dos o más subunidades de ribocápside de ARNt, (v) un ácido nucleico de núcleo, dos o más subunidades de ribocápside de ARNt, y una o más envueltas de nuclión predefinidas, (vi) un nuclión de ARNt básico y una o más envueltas de nuclión predefinidas, (vii) un nuclión con envuelta y una o más envueltas de nuclión predefinidas, (viii) una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo, y (ix) un híbrido de dos o más miembros de este grupo. En otro aspecto, el método está  
25 seleccionado del grupo que consiste en (1) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside, (2) añadir una o más preparaciones de ácido nucleico de núcleo a una preparación de subunidad de ribocápside, (3) añadir una o más preparaciones de subunidad de ribocápside a una preparación de ácido nucleico de núcleo, (4) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo inmovilizada directamente o indirectamente sobre una fase sólida con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside que  
30 no están inmovilizadas, (5) combinar una o más preparaciones de subunidad de ribocápside inmovilizadas directamente o indirectamente sobre una fase sólida con una preparación de ácido nucleico de núcleo que no está inmovilizado, (6) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo inmovilizada directamente o indirectamente sobre una fase sólida con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside inmovilizadas directamente o indirectamente sobre una fase sólida, (7) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside usando un proceso discontinuo, (8) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside usando un proceso continuo, (9) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside, luego mezclar la combinación, (10) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside, luego separar los nucliones resultantes del ácido nucleico de núcleo no en nucliones, (11) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside, luego separar los nucliones resultantes de las subunidades de ribocápside no en nucliones, (12) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside, luego separar los nucliones resultantes de tanto el ácido nucleico de núcleo no en nucliones como las subunidades de ribocápside no en nucliones, (13) combinar una preparación de nuclión básico con una o más preparaciones de envuelta de nuclión, (14) añadir una o más preparaciones de nuclión básico a una preparación de envuelta de nuclión, (15) añadir una o más preparaciones de envuelta de nuclión básico a una preparación de nuclión, (16) combinar una preparación que contiene nucliones básicos inmovilizados directamente o indirectamente sobre una fase sólida con una o más preparaciones que contienen envueltas de nuclión que no están inmovilizadas, (17) combinar una o más preparaciones que contienen envueltas de nuclión inmovilizadas directamente o indirectamente sobre una fase sólida con una preparación que contiene nucliones básicos que no están inmovilizados, (18) combinar una o más preparaciones que contienen nucliones básicos inmovilizados directamente o indirectamente sobre una fase sólida con una o más preparaciones que contienen envueltas de nuclión inmovilizadas directamente o indirectamente sobre una fase sólida, (19) combinar una o más preparaciones de nuclión básico con una o más preparaciones de envuelta de nuclión usando un proceso discontinuo, (20) combinar una o más preparaciones de nuclión básico con una o más preparaciones de envuelta de nuclión usando un proceso continuo, (21) combinar una o más preparaciones de nuclión básico con una o más preparaciones de envuelta de nuclión, luego mezclar la combinación, (22) combinar una o más preparaciones de nuclión básico con una o más preparaciones de envuelta de nuclión, luego separar los nucliones con envuelta resultantes de los nucliones no en nucliones con envuelta, (23) combinar una o más preparaciones de nuclión básico con una o más preparaciones de envuelta de nuclión, luego separar los nucliones con envuelta resultantes de las envueltas de nuclión no en nucliones con envuelta, (24) combinar una o más preparaciones de nuclión básico con una o más preparaciones de envuelta de nuclión, luego separar los nucliones con envuelta resultantes de tanto los nucliones básicos no en nucliones con envuelta como las envueltas de nuclión no en nucliones con envuelta, (25) combinar una o más preparaciones de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de unidad de ribocápside y una o más preparaciones de envuelta de nuclión, (26) combinar una o más preparaciones de ácido nucleico de núcleo con una

o más preparaciones de unidad de ribocápside y una o más preparaciones de envuelta de nuclión, luego mezclar la combinación, (27) combinar una o más preparaciones de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de unidad de ribocápside y una o más preparaciones de envuelta de nuclión, luego separar los nucliones con envuelta resultantes de la combinación resultante, (28) combinar una o más preparaciones de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de unidad de ribocápside y una o más preparaciones de envuelta de nuclión en un proceso discontinuo, (29) combinar una o más preparaciones de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de unidad de ribocápside y una o más preparaciones de envuelta de nuclión en un proceso continuo, (30) una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo, y (31) un híbrido de cualesquiera dos o más miembros de este grupo.

En otro aspecto, el método comprende además una o más etapas seleccionadas del grupo que consiste en (1) emplear una relación molar de subunidades de ribocápside con respecto a ácido nucleico de núcleo superior a aproximadamente 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000; (2) incluir cloruro de magnesio, iones magnesio o sales de magnesio a una concentración en solución superior a aproximadamente 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 milimoles por litro; (3) omitir poliaminas de todas las soluciones y preparaciones; (4) asegurar que todas las soluciones y preparaciones estén libres de nucleasas; (5) asegurar que todas las soluciones, equipo, soportes, consumibles, suministros y otros artículos que se ponen en contacto con los reactantes o producto estén sustancialmente libres de ribonucleasas; (6) emplear uno o más inhibidores de ribonucleasa que no interfieren con el ensamblaje de nucliones o la integridad de productos; (7) dejar tiempo suficiente para el ensamblaje en el que dicho tiempo supera 0,1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180, 240 o 300 segundos, (8) emplear un entorno de ensamblaje no desnaturizante, (9) realizar actividades de ensamblaje a una temperatura inferior a aproximadamente 0, 4, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55 o 60 grados Celsius (°C); (10) reticular químicamente uno o más componentes de nuclión; (11) cualquier combinación de dos o más de los miembros de este grupo, y (12) cualquier híbrido de dos o más miembros de este grupo.

En otro aspecto, el método comprende además aislar el nuclión por una o más etapas seleccionadas del grupo que consiste en separación basada en tamaño, separación basada en forma, separación basada en masa, separación basada en afinidad química, separación basada en propiedades inmunológicas, separación basada en propiedades eléctricas, separación usando un resto de biotina unido a un componente de nuclión, separación usando una sonda de ácido nucleico unida a un componente de nuclión, separación basada en propiedades osmóticas, separación basada en propiedades magnéticas, separación basada en solubilidad, separación basada en electroforesis en un gel no desnaturizante, fraccionamiento de bandas tras la separación en un gel no desnaturizante, filtración, diálisis, cromatografía de exclusión en gel, cromatografía de intercambio iónico, y una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo. En otro aspecto, el método comprende además estabilizar el nuclión, durante o tras la fabricación, por una o más etapas seleccionadas del grupo que consiste en modificación química, modificación física, reticulación, reticulación de un componente de nuclión, reticulación de dos o más componentes de nuclión, introducción de un enlace covalente entre dos o más bases en hebras separadas de ácido nucleico, exposición a una mostaza nitrogenada bifuncional, exposición a cis-diaminodicloroplatino, exposición a formaldehído, exposición a un psoraleno, exposición a 4,5',8-trimetilpsoraleno, exposición a 8-metoxipsoraleno, exposición a 4-aminometil-4,5',8-trimetilpsoraleno, liofilización, congelación, secado, refrigeración, adición de un inactivador, adición de un antioxidante, adición de un secuestrante, adición de un emulsionante, adición de un excipiente, adición de un tensioactivo, adición de un estabilizador de ultravioleta, adición de un inhibidor de ribonucleasas, y una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático de un ejemplo de un nuclión que contiene cuatro subunidades de ribocápside (marcadas R1 a R4) unido a una molécula de ácido nucleico de núcleo (CNA). C representa un codón en el CNA. AC representa un anticodón en el ácido nucleico de ribocápside. Una flecha indica la unión de un sitio de conector (CS) en una subunidad de ribocápside a un sitio de enlace (LS) en otra subunidad de ribocápside.

La Figura 2 es un diagrama esquemático de un ejemplo de un nuclión de ARNt que contiene cuatro moléculas de ARN de transferencia aminoacilado (marcadas T1 a T4) unido a una molécula de ARN mensajero (ARNm). 5' y 3' marcan la dirección de los extremos del ARNm. AA1 a AA4 representan los aminoácidos acilados con respecto a las moléculas de ARNt. C representa un codón en el ARNm. AC representa un anticodón en un ARNt. Una flecha indica la unión de un conector de ARNt (TC) en un ARNt a un sitio de enlace de ARNt (TLS) en otro ARNt.

La Figura 3A es una presentación esquemática de los nucleósidos de ARNt más conservados en el formato de una estructura secundaria de ARNt consenso, donde la numeración de la localización de los nucleósidos sigue el convenio adoptado por los autores de la base de datos de tRNADB. Las líneas de puntos indican el emparejamiento de bases canónicas y las flechas indican el apilamiento de (i) el tallo de aminoácido (1-7; 66-72) con el tallo de pseudouridina (49-53; 61-65), y (ii) el tallo anticodón (27-31; 39-43) con el tallo de dihidrouridina (10-13; 22-25). Otros elementos estructurales de ARNt marcados incluyen el sitio de unión de aminoácido ('aa' dentro de un círculo próximo a 76), el bucle de pseudouridina (54-60), el bucle anticodón (32-38) que contiene el

anticodón (34-36 dentro del recuadro verde), el bucle de dihidrouridina (14-21) y el bucle variable (44-47). Las setenta y seis localizaciones marcadas 1-76 están normalmente ocupadas por un nucleótido y están marcadas O (de ocupado), a menos que se marquen de otro modo para prevalencia (véase más adelante). A diferencia, veintitrés localizaciones (0, 17a, 20a, 20b, e1-5, e11-17 y e21-27) no están normalmente ocupadas y están marcadas E (de extra). Los recuadros amarillos indican localizaciones donde un grupo de nucleósidos (G, A, C o U, junto con cualquier modificación de los mismos) tiene una prevalencia de secuencias (SP) del 90 % o más dentro de estas 623 secuencias. Las letras en tipo normal o cursivo dentro de tales recuadros amarillos indican, respectivamente, (i) el grupo de nucleósidos con una SP de más del 90 % en esa localización (G, A, C o U) o (ii) el nucleósido modificado con una SP de más del 50 % en esa localización (P o T). Los recuadros azules indican localizaciones donde la clase de nucleósidos (purina o pirimidina) tiene una SP del 90 % o más. Las letras en tipo regular o cursivo dentro de tales recuadros de clases de nucleósidos indican, respectivamente, (i) la clase de nucleósidos con una SP de más del 90 % en esa localización (R de purina, Y de pirimidina) o (ii) el nucleósido modificado con una SP de más del 50 % en esa localización (H de adenosina modificada). La D en la localización 20 indica dihidrouridina con una SP de más del 50 % en esa localización.

La Figura 3B es una tabla de los símbolos de prevalencia de secuencias y abreviaturas de nucleósidos usados en la Figura 3A. Ciertos nucleósidos están marcados con un asterisco para indicar que los datos relacionados se refieren a tanto las formas básicas como las modificadas de tales nucleósidos.

La Figura 4A es una transparencia superpuesta de modelado informático de diez estructuras de ARNt informadas (determinadas por estudios de difracción de rayos X de cristales de ARNt) vista desde el lado derecho de las moléculas y preparada usando el software PyMOL para ilustrar las localizaciones de los esqueletos de fosfodiéster y sus nucleósidos unidos.

La Figura 4B es una vista desde el lado de los ARNt distales al sitio de aminoácidos de las mismas estructuras que aquellas presentadas en la Figura 4A.

La Figura 4C proporciona la clave de colores y otra información para las estructuras presentadas en la Figura 4A y Figura 4B. La columna marcada AA indica la especificidad de aminoácido de cada ARNt. La columna marcada PDB da la referencia a la entrada de estructura en Protein Data Bank, de la que se derivaron los datos y en la que se citan los investigadores del estudio.

La Figura 5A es un topograma de prevalencia de nucleósidos para el ARN de transferencia que informa de los resultados de minería de datos en 623 secuencias de ARNt informadas para nucleósidos con una prevalencia de secuencias del 90 % o más, presentado en un modelo informático generado por PyMOL de la estructura terciaria de ARNt<sup>Phe</sup> de levadura. Se emplean representaciones que llenan el espacio de todos los átomos componentes (excepto hidrógeno). Se identifican cuatro zonas de conservación.

La Figura 5B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 5A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B.

La Figura 6A es un modelo informático del sitio de enlace de ARNt (TLS) en ARNt<sup>Phe</sup> de levadura y sus nueve nucleósidos de TLS conservados, que comprende ocho nucleósidos GSP90 y una purina PSP90, apilados en cinco capas marcadas L1 a L5. Los átomos en estos nucleósidos de TLS se muestran como que llenan el espacio; otros nucleósidos están representados por malla.

La Figura 6B muestra que los nucleósidos de TLS en la Figura 6A están apareados en bases con otros nucleósidos de TLS y por qué método.

La Figura 6C proporciona la clave de colores para los nucleótidos de TLS en la Figura 6A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B.

La Figura 7A es una transparencia superpuesta de modelado informático de nueve nucleósidos de TLS de las diez estructuras de ARNt informadas mostradas en la Figura 4A y Figura 4B, pero usando una representación de varillas de los nucleósidos. El TLS se visualiza desde la parte de arriba de la molécula de ARNt, con el tallo anticodón en la dirección z (lejos del observador) y el tallo de aminoácido en la dirección y (hacia la parte superior de la página).

La Figura 7B proporciona la clave de colores y otra información para las estructuras presentadas en la Figura 7A. La columna marcada AA indica la especificidad de aminoácido de cada ARNt. La columna marcada PDB da la referencia a la entrada de estructura en Protein Data Bank, de la que se obtuvieron los datos y en la que se citan los investigadores del estudio.

La Figura 8A es un modelo informático de dos moléculas de ARNt<sup>Phe</sup> de levadura de conformación L aminoacilado (marcadas ARNt1 y ARNt2) unidas a codones adyacentes en ARNm dentro de un nuclión con forma de T. La línea discontinua es el eje del nuclión, marcado 5' y 3' para indicar la dirección del ARNm.

La Figura 8B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 8A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B.

5 La Figura 9A es un modelo informático de tres moléculas de ARNt<sup>Phe</sup> de levadura de conformación L aminoacilado (marcadas ARNt1, ARNt2 y ARNt3) unidas a codones consecutivos en ARNm dentro de un nuclión con forma de T, cuando se ven en el eje del nuclión desde la dirección 5'.

10 La Figura 9B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 9A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B.

La Figura 10A es un modelo informático de diez moléculas de ARNt<sup>Phe</sup> de levadura de conformación L aminoaciladas unidas a codones consecutivos en ARNm en un nuclión con forma de T. La línea discontinua muestra el eje del nuclión, marcado 5' y 3' para indicar la dirección del ARNm.

15 La Figura 10B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 10A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B.

20 La Figura 11 es un modelo informático de codones de ARNm unidos a anticodones de ARNt en conformaciones S y T adyacentes de un nuclión de ARNt (no se muestran otros átomos de ARNt). Los codones de ARNm son naranjas. Todos los otros colores son anticodones de ARNt. La tabla adyacente presenta los valores de aumento de hélice y de giro de hélice por ARNt para las hélices de nuclión correspondientes a estas dos conformaciones de nuclión, junto con las conformaciones anticodón de ARNt asociadas.

25 La Figura 12A es un modelo informático de la conformación K del bucle anticodón en un ARNt, junto con un codón al que está unido, donde el bucle anticodón y codón se representan por varillas. El anticodón de tallo en ARNt se representa como malla. U33 es la uridina GSP90 conservada en la posición 33. Pu37 es la purina PSP90 conservada en la posición 37.

30 La Figura 12B es un modelo informático de la conformación L del bucle anticodón en un ARNt, junto con un codón al que está unido, donde el bucle anticodón y codón se representan por varillas. El anticodón de tallo en ARNt se representa como malla. U33 es la uridina GSP90 conservada en la posición 33. Pu37 es la purina PSP90 conservada en la posición 37.

35 La Figura 13A es un modelo informático de cuatro moléculas de ARNt<sup>Phe</sup> de levadura de conformación K aminoacilado (marcadas ARNt1, ARNt2, ARNt3 y ARNt4) unidas a codones adyacentes en ARNm dentro de un nuclión con forma de S. La línea discontinua es el eje del nuclión, marcado 5' y 3' para indicar la dirección del ARNm.

40 La Figura 13B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 13A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B.

45 La Figura 14A es un modelo informático de una molécula de ARNt<sup>Phe</sup> de levadura en conformación L unida como una tapa de nuclión de conformación R a un codón en ARNm. Se muestran los anticodones de varios ARNt en la dirección 3' (junto con sus codones correspondientes), pero no el equilibrio de estas moléculas. La línea discontinua es el eje del nuclión, marcado 5' y 3' para indicar la dirección del ARNm.

La Figura 14B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 14A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B.

50 La Figura 15 es un diagrama esquemático de un compuesto nuclión de ARNt que contiene once moléculas de ARNt aminoaciladas dentro de tres conformaciones de nuclión, como se identifica por la tabla de información asociada. Los convenios esquemáticos para ARNt se definen en la imagen presentada en la esquina inferior izquierda.

55 La Figura 16 es un modelo informático de un compuesto de nuclión de ARNt y una tabla de información asociada, ambos de los cuales se corresponden con el dibujo esquemático en la Figura 15. Se muestran dos ARNt aminoacilados unidos al ARNm en la dirección 3' del nuclión. La línea discontinua es el eje del nuclión, marcado 5' y 3' para indicar la dirección del ARNm que es naranja.

60 La Figura 17 es una tabla de las propiedades de las tres conformaciones de nucliones de ARNt. El símbolo ~ significa sustancialmente dentro del intervalo de los números indicados.

65 La Figura 18 es un dibujo de la marca del codón de iniciación (inicio) por ARNt en bacterias y orgánulos eucariotas relacionados, antes (arriba) y después (abajo) de la formación de un nuclión de iniciación. T(N-1) a T(N+2) representan moléculas de ARNt. AA representa un aminoácido unido a un ARNt elongador. F-Met (formil-metionina) está unida al ARNt iniciador. 5' y 3' marcan la dirección de los extremos del ARNm. C representa un

codón en el ARNm. AC representa un anticodón en un ARNt. R y S indican la conformación de nuclión en ese ARNt. Las flechas inclinadas indican la unión de un conector de ARNt (TC) en un ARNt a un sitio de enlace de ARNt (TLS) en otro ARNt. El signo de 'prohibido estacionar' indica que el conector TC no puede unirse al sitio TLS en el ARNt en la dirección 5' adyacente.

5 La Figura 19 es un dibujo de marca del codón de iniciación (inicio) por ARNt en el citoplasma de eucariotas, antes (arriba) y después (abajo) de la formación de un nuclión de iniciación. T(N-1) a T(N+2) representan moléculas de ARNt, AA representa un aminoácido unido a un ARNt elongador. Met (metionina) está unida al ARNt iniciador. 5' y 3' marcan la dirección de los extremos del ARNm. C representa un codón en el ARNm. AC representa un anticodón en un ARNt. R y S indican la conformación de nuclión en ese ARNt. Las flechas inclinadas indican la unión de un conector de ARNt (TC) en un ARNt a un sitio de enlace de ARNt (TLS) en otro ARNt. El signo de 'prohibido estacionar' indica que el sitio TLS modificado no puede unirse al conector TC en el ARNt en la dirección 3' adyacente.

10 La Figura 20A es un modelo informático de una tapa de ARNt de nuclión con forma de R primordial (o contemporáneo anormal) (ARNt1) que cataliza la transferencia de peptidilo entre las colas CCA en los dos ARNt siguientes en la dirección 3': ARNt2 (que mantiene la cadena de polipéptidos en crecimiento) y ARNt3 (que mantiene el siguiente aminoácido). La línea discontinua es el eje del nuclión, marcado 5' y 3' para indicar la dirección del ARNm.

15 La Figura 20B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 20A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B.

20 La Figura 21 es un diagrama esquemático de síntesis de proteínas por un nuclión compuesto primordial (o contemporáneo anormal) que contiene once moléculas de ARNt, nueve de los cuales están aminoacilados, uno de los cuales (ARNt2, verde) está acilado con el polipéptido en crecimiento (marcado 'Proteína') y uno de los cuales, la tapa de ARNt (ARNt1, rojo), no está acilado con un aminoácido o péptido. Dos ARNt en solución libre se muestran esquemáticamente para indicar ARNt libres que se recargan y recirculan. Los convenios esquemáticos para ARNt se definen en la imagen presentada en la esquina superior derecha.

25 La Figura 22 es un modelo informático de síntesis de proteínas por un nuclión de ARNt compuesto correspondiente al dibujo esquemático en la Figura 21, con la adición de dos ARNt aminoacilados en ARNm en la dirección 3' desde el nuclión y un ARNt sin cargar en solución libre. Las moléculas rojas pequeñas son aminoácidos. El polipéptido que surge de la parte superior del nuclión es rojo. El ARNm es naranja.

30 La Figura 23A es un modelo informático de una tapa de ARNt primordial (o contemporáneo anormal) (ARNt1) que cataliza la transferencia de peptidilo entre las colas de CCA de los dos siguientes ARNt unidos a ARNm: ARNt2, que mantiene la cadena de polipéptidos en crecimiento (en la que solo se muestra el primer aminoácido y está marcado 'Polipéptido'), y ARNt3, que mantiene el siguiente aminoácido (marcado 'Aminoácido'). Los nucleótidos participantes están apilados en seis capas, marcadas L0 a L5.

35 La Figura 23B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 23A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B. Los enlaces negros con extremos redondos entre ciertos nucleósidos indican algunas de las interacciones intermoleculares que contribuyen a la transferencia de peptidilo. Las columnas en la tabla indican que los nucleósidos de los tres ARNt se alinean en las seis capas de sitio activo marcadas L0 a L5.

40 La Figura 24A es un modelo informático de seis nucleósidos en los niveles 3 y 4 del complejo cuaternario formado por los tres ARNt participantes en el centro de transferencia de peptidilo (PTC) de un nuclión primordial (o contemporáneo anormal), cuando se ve desde la dirección del tallo de pseudouridina en el ARNt1 de ribozima. La elipse marcada 'Reacción' resalta el sitio activo donde el grupo amino en el ARNt3 de aminoacilo ataca el grupo carboxilo en el ARNt2 de peptidilo. Solo se muestra el primer aminoácido en la cadena de polipéptidos.

45 La Figura 24B muestra la reacción de transferencia de peptidilo entre los dos nucleótidos de adenosina A76 en ARNt2 y ARNt3, cuando se ve desde por encima de PTC de un nuclión primordial (o contemporáneo anormal), que transfiere la cadena de polipéptidos en crecimiento de ARNt2 a ARNt3. La elipse marcada 'Reacción' resalta el sitio activo donde el grupo amino en el ARNt3 de aminoacilo ataca el grupo carboxilo en el ARNt2 de peptidilo. Solo se muestra el primer aminoácido en la cadena de polipéptidos.

50 La Figura 24C proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 24A y la Figura 24B usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B. Los enlaces negros con extremos redondos entre ciertos nucleósidos indican interacciones intermoleculares en las capas L3 y L4 que contribuyen a la transferencia de peptidilo.

55 La Figura 25A muestra un modelo informático de la ribosiltimina en la posición 54 (T54) en el TLS en ARNt contemporáneo normal (ARNt1). El grupo metilo resaltado bloquea la unión de la adenosina en la posición 76 en el CCA en ARNt2 (no mostrado).

La Figura 25B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 25A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B.

La Figura 25C muestra un modelo informático de pseudouridina en la posición 54 (P54) en el PLS en ARNt primordial o contemporáneo anormal (ARNt1) junto con la unión habilitada de la adenosina en la posición 76 en el CCA en el ARNt en la dirección 3' adyacente (ARNt2).

La Figura 25D proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 25C usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B. El enlace negro con extremos redondos indica el apareamiento de bases intermolecular.

La Figura 26 es una tabla de la lógica de control para operaciones de nucliones y resume los estados de los sitios TLS izquierdo y derecho, conducidos en parte por los nucleósidos en las posiciones 54 y 55 en un primer ARNt T(N). Se presentan las condiciones de nucliones asociadas y resultantes. T(N-1) se refiere al ARNt adyacente inmediatamente en la dirección 5' del primer ARNt, y T(N+1) se refiere al ARNt adyacente inmediatamente en la dirección 3' del primer ARNt. ARNt(N+2) es el ARNt inmediatamente en la dirección 3' de ARNt(N+1).

La Figura 27A es un modelo informático del sitio de unión de espermina a partir de una estructura de alta resolución informada para ARNt<sup>Phe</sup> de levadura, cuando se ve desde el lado izquierdo del TLS. La espermina está unida en gran parte por la ribosiltimina en la posición 54 (T54) y la pseudouridina en la posición 55 (P55).

La Figura 27B es el modelo informático presentado en la Figura 27, cuando se ve desde el extremo del TLS distal a la cola de aminoácido.

La Figura 28 es un modelo informático de 12 moléculas EF-Tu (marcadas E1 a E12) cuando se unen a 12 ARNt en un nuclión con forma de T, generando una cápside de proteína alrededor del nuclión de ácido nucleico. T12 marca ARNt12 al que E12 está unido. La línea discontinua es el eje del nuclión, marcado 5' y 3' para indicar la dirección del ARNm.

La Figura 29 es un modelo informático de 4 moléculas EF-Tu (marcadas E1 a E4) unidas a cuatro ARNt en un nuclión con forma de S. Los ARN de transferencia 3, 4 y 5 están marcados por T3, T4 y T5, respectivamente. La línea discontinua es el eje del nuclión, marcado 5' y 3' para indicar la dirección del ARNm.

La Figura 30A es un modelo informático de una conformación de pre-unión de EF-Tu alineado con ARNt2 (marcado T2) que está unida al ARNt1 en la dirección 5' inmediata. La clave de color para los nucleótidos de ARNt es la misma que aquella en la Figura 8B. La línea discontinua es el eje del nuclión, marcado 5' y 3' para indicar la dirección del ARNm.

La Figura 30B es una vista más próxima del modelo informático mostrado en la Figura 30A desde un ángulo diferente. EF-Tu está marcado E.

La Figura 30C es un modelo informático de una conformación post-unión de EF-Tu alineado con ARNt2 que se elimina del ARNt1 en la dirección 5' inmediata.

La Figura 30D es una vista más próxima del modelo informático mostrado en la Figura 30C del mismo ángulo que la Figura 30B. ARNt1 está marcado T1.

La Figura 31A es un modelo informático de cuatro moléculas EF-Tu (E2 a E5) unidas a sus cuatro ARNt relacionados en un nuclión con forma de S. La línea discontinua es el eje del nuclión, marcado 5' y 3' para indicar la dirección de ARNm general.

La Figura 31B es un modelo informático de la estructura molecular mostrada en la Figura 31A cuando una tapa de ARNt (T1) se añade al nuclión con envuelta. La cola de aminoácidos CCA de esta tapa de ARNt se asienta en una hendidura en EF-Tu 4 (E4) unido a ARNt4.

La Figura 31C es un modelo informático de la estructura molecular mostrada en la Figura 31B cuando EF-Tu 1 (E1) se une a la tapa de ARNt T1, que entonces se intercala entre EFTu-1 y EFTu-4.

La Figura 32A muestra el modelo informático de la Figura 31A, cuando se ve desde la dirección 5' en el eje del nuclión. Los convenios de marcado son los mismos.

La Figura 32B muestra el modelo informático de la Figura 31B, cuando se ve desde la dirección 5' en el eje del nuclión. Los convenios de marcado son los mismos.



## ES 2 639 420 T3

La Figura 32C muestra el modelo informático de la Figura 31C, cuando se ve desde la dirección 5' en el eje del nuclión. Los convenios de marcado son los mismos.

5 La Figura 33A es un gráfico que muestra la fracción (eje y) de Met-ARN<sup>t</sup>eMet hidrolizado con respecto al tiempo en minutos (eje x) a una temperatura de 37 °C.

La Figura 33B es un gráfico que muestra la fracción (eje y) de Met-ARN<sup>t</sup>eMet hidrolizado con respecto al tiempo en minutos (eje x) a una temperatura de 10 °C.

10 La Figura 33C es un gráfico que muestra la fracción (eje y) de Cys-ARN<sup>t</sup>Cys hidrolizado con respecto al tiempo en minutos (eje x) a una temperatura de 37 °C.

15 La Figura 34A es una imagen de radiactividad de un gel no desnaturalizante realizada a temperatura ambiente ('temp amb') para comparar el efecto de la relación de ARN<sup>t</sup> con respecto a ARN<sup>m</sup> ('Relación molar') en el ensamblaje de nucliones a una temperatura de reacción ('Temp de reac') de 37 °C y en un baño de hielo. Las bandas de gel asociadas a ARN<sup>m</sup>, y los complejos de nuclión 1 a 5, están marcados en consecuencia.

20 La Figura 34B es una imagen de radiactividad de un gel no desnaturalizante realizada en la sala fría para comparar el efecto de la relación de ARN<sup>t</sup> con respecto a ARN<sup>m</sup> ('Relación molar') en el ensamblaje de nucliones a una temperatura de reacción ('Temp de reac') de 37 °C y en un baño de hielo.

La Figura 34C es un gráfico obtenido cuantificando las bandas marcadas con <sup>32</sup>P correspondientes a ARN<sup>m</sup> y los complejos 1-5 en la Figura 34A usando ImageQuant.

25 La Figura 34D es un gráfico obtenido cuantificando las bandas marcadas con <sup>32</sup>P correspondientes a ARN<sup>m</sup> y los complejos 1-5 en la Figura 34B usando ImageQuant.

30 La Figura 35A es una imagen de radiactividad de un gel no desnaturalizante en un estudio para determinar el efecto de la concentración de cloruro de magnesio ('MgCl<sub>2</sub>') en el ensamblaje de nucliones. Las bandas de gel asociadas a ARN<sup>m</sup>, y los complejos de nuclión 1 a 5, están marcados en consecuencia.

La Figura 35B es un gráfico obtenido cuantificando las bandas marcadas con <sup>32</sup>P correspondientes a ARN<sup>m</sup> y los complejos 1-5 en la Figura 35A usando ImageQuant.

35 La Figura 35C es un gráfico que presenta los datos de la Figura 35B inferiores a una concentración de cloruro de magnesio 100 mM.

40 La Figura 36 es una imagen de radiactividad de un gel no desnaturalizante en un estudio para determinar los efectos del estado de aminoacilación y el reconocimiento de codones en el ensamblaje de nucliones en presencia o ausencia de cloruro de magnesio 150 mM.

45 La Figura 37 es una imagen de radiactividad de un gel no desnaturalizante en un estudio para determinar el transcurso de tiempo del ensamblaje de nucliones a una relación molar de ARN<sup>t</sup>:ARN<sup>m</sup> de 3200 ('min' indica minutos).

La Figura 38A es una imagen de radiactividad de un gel no desnaturalizante en un estudio para determinar el transcurso de tiempo de disociación de nucliones causado mediante la adición de ARN<sup>m</sup> competitivo ('min' indica minutos).

50 La Figura 38B es un gráfico obtenido cuantificando las bandas marcadas con <sup>32</sup>P correspondientes a ARN<sup>m</sup> y los complejos del mismo en la Figura 38A usando ImageQuant, y calculando la fracción de ARN<sup>m</sup> complejado en nucliones.

55 La Figura 39A es una imagen de radiactividad de un gel no desnaturalizante en un estudio para determinar las relaciones molares de ARN<sup>t</sup> con respecto a ARN<sup>m</sup> en nucliones, donde el ARN<sup>m</sup> tiene 1, 2, 3, 4, 6 o 9 codones AUG.

60 La Figura 39B es un histograma obtenido cuantificando las bandas marcadas con <sup>32</sup>P correspondientes a ARN<sup>m</sup> y complejos del mismo en la Figura 39A usando ImageQuant, y que presentan la fracción de ARN<sup>m</sup> complejado en las bandas respectivas.

65 La Figura 40 es una imagen de radiactividad de un gel no desnaturalizante en un estudio para determinar si se forman o no complejos poliméricos con ARN<sup>t</sup> aminoacilado solo, a concentraciones que oscilan de 0,075 a 20 micromolar ('uM').

La Figura 41 es una imagen de radiactividad de un gel no desnaturante en un estudio para determinar la unión de diversas combinaciones de cuatro ARNt aminoacilados con un ARNm que contiene una secuencia de Shine-Dalgarno en la dirección 5' de una secuencia que codifica fMF<sub>3</sub>CFC. El primer carril refleja los resultados con ARNm solo; el segundo carril y carriles posteriores reflejan los resultados con ARNm y uno o más ARNt aminoacilados con especificidad marcados del siguiente modo: C = cisteína, F = fenilalanina, iM = metionina (ARNt iniciador) y eM = metionina (ARNt elongador).

La Figura 423A es una imagen de radiactividad de un gel no desnaturante en un estudio para medir el efecto de la relación molar de ARNt con respecto a ARNm sobre el grado de formación de nucliones, usando un ARNm que contiene una secuencia de Shine-Dalgarno en la dirección 5' de una secuencia que codifica fMF<sub>3</sub>CFC.

La Figura 42B es un gráfico obtenido cuantificando las bandas marcadas con <sup>32</sup>P correspondientes a ARNm y complejos del mismo en la Figura 42Figura 423A usando ImageQuant, y calculando la fracción de ARNm complejo en nucliones.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento por los inventores de una estructura biológica llamada un nuclión. El diagrama esquemático en la Figura 1 ilustra algunas características de un nuclión como se enseña por la presente descripción. Los presentes inventores adoptaron la palabra 'nuclión' en paralelo a la palabra 'virión', un término usado por los científicos y médicos para describir una partícula de virus intacta, aunque la mayoría de los nucliones tienen atributos que son sustancialmente diferentes de los de la mayoría de los virus.

En el presente documento se describe una nueva plataforma tecnológica basada en nucliones y ribocápsides, y aplicaciones específicas de esta tecnología para las industrias farmacéutica, de biotecnología y nanotecnología se describen en el presente documento. En el presente documento se describen (i) composiciones de nucliones, ribocápsides, sus componentes y estructuras relacionadas, y (ii) métodos para la fabricación, aislamiento, purificación, ensayo y personalización de estas composiciones, y (iii) aplicaciones industriales de tecnología de nuclión y ribocápside, entre otros, para identificar nuevas dianas moleculares de importancia médica. Por ejemplo, los nucliones, ribocápsides, sus componentes y estructuras relacionadas descritos en el presente documento tienen aplicaciones industriales para el desarrollo de métodos *in vitro* e *in vivo* para la promoción o la inhibición de la traducción de una proteína a partir de ARN, modulando la estructura o actividad de los nucliones naturales relacionados. Además, los nucliones y estructuras relacionadas definidos y sintetizados como se describe en el presente documento tienen aplicaciones industriales como modelo experimental para un bioensayo *in vitro* para el cribado de componentes de nuclión naturales y otras composiciones para alterar la formación de un nuclión natural *in vivo* y así producir un resultado terapéutico, de diagnóstico o profiláctico que es médicamente útil.

Como se describe en el presente documento, cada nuclión contiene un ácido nucleico de núcleo (CNA), la totalidad o parte del cual está unido a una o más cáscaras oligoméricas o poliméricas de subunidades que son principalmente ácido nucleico. Los presentes inventores llaman la cáscara de un nuclión a una 'ribocápside' para distinguir esta cubierta de ácido nucleico de la 'cápside' de proteína encontrada en los virus. Las subunidades de ribocápside pueden diferenciarse (identificadas como R1 a R4 en la Figura 1) en su composición química, pero tienen homología estructural suficiente con el fin de mantener la integridad de la ribocápside. Por ejemplo, cada subunidad de ribocápside puede contener al menos tres sitios de unión intermolecular. Dos de estos sitios, llamados el 'sitio de conector' ('CS') y el 'sitio de enlace' ('LS'), sirven para unir subunidades adyacentes entre sí. El tercer sitio intermolecular en cada subunidad de ribocápside se llama un 'anticodón' ('AC'), una secuencia de nucleótidos que se une a un 'codón' ('C') sustancialmente complementario en el ácido nucleico de núcleo. Las interacciones codón-anticodón eran previamente conocidas para aquellos expertos en la materia, pero las interacciones entre el conector y los sitios de enlace en subunidades de ribocápside adyacentes no han sido previamente informadas.

El nuclión puede estabilizarse en parte por la unión entre sitios CS y LS en subunidades de ribocápside adyacentes, al mismo tiempo que los anticodones en estas moléculas se unen a sus codones respectivos en el CNA. La estructura y localización de estos sitios CS y LS pueden estar suficientemente conservadas a través de diferentes subunidades con el fin de normalizar la geometría de ribocápside global, simultáneo con ciertas variaciones estructurales permitidas dentro de regiones definidas de las moléculas de subunidad individuales. Los sitios CS y LS pueden estar orientados hacia las direcciones 3' y 5' del ácido nucleico de núcleo, respectivamente. Los sitios CS y LS pueden estar orientados hacia las direcciones 5' y 3' del ácido nucleico de núcleo, respectivamente. Los nucleótidos en los sitios de codón y anticodón pueden variar rutinariamente (mientras que sigan siendo sustancialmente complementarios), para permitir que el CNA se una específicamente a diferentes subunidades y realice otras funciones biológicas.

Una forma de un nuclión es un nuclión de ARN de transferencia ('ARNt'), en el que múltiples moléculas de ARNt sirven de subunidades oligoméricas o poliméricas para formar una ribocápside de ARNt alrededor de una molécula de ARN mensajero, como se representa en el diagrama esquemático de la Figura 2. El anticodón ('AC') en cada ARNt de ribocápside (T1 a T4) puede ser una secuencia de tres nucleótidos que se une a un codón ('C') de nucleótidos complementarios en el ARNm en el núcleo del nuclión. Moléculas de ARNt consecutivas se unen a

codones de correspondencia consecutivos en el ARNm. El sitio CS de ribocápside en cada ARNt (llamado el 'conector de ARNt' o 'TC') es su 'cola de CCA' (la secuencia de tres nucleótidos en el extremo 3' de la molécula de ARNt), que puede o puede no unirse (normalmente por acilación) a un aminoácido ('aminoacilado'). El sitio LS de ribocápside en ARNt (llamado el 'sitio de enlace de ARNt' o 'TLS') está localizado en el codo de ARNt formado por interacción intramolecular entre los bucles de pseudouridina y dihidouridina. El TC en un ARNt puede conectar con el TLS en el ARNt adyacente unido a ARNm en la dirección 5' (5' ARNm).

En células contemporáneas, nucliones de ARNt natural sirven para limitar y proteger el ARN mensajero, marcar codones de iniciación, proporcionar registro del marco, almacenar ARNt aminoacilados y aumentar la eficiencia de traducción. Nucliones primordiales, que contuvieron una versión ancestral del TLS, fueron pioneros en la síntesis de proteínas antes de la aparición de los ribosomas. Con el fin de mantener el control celular apropiado en células contemporáneas, tal síntesis de proteínas no debe ser permitida por nucliones fuera del ribosoma. Sin embargo, estudios de minería de datos indican que las inversiones de TLS a configuraciones primordiales se producen en la naturaleza, y pueden producir ciertos cánceres en organismos superiores, desencadenando la transferencia de peptidilo incontrolada y/o proliferación celular. Ciertos virus pueden falsificar estructuras de nuclión cuando invaden células con el fin de corromper o apropiarse de la maquinaria de traducción de las células. Estos sorprendentes conocimientos en la existencia, estructura, función y propiedades de nucliones y ribocápsides, junto con un entendimiento sin precedentes de sus limitaciones biológicas y disfunción, proporcionan una nueva plataforma tecnológica para biotecnología y nanotecnología, y presentan nuevas dianas específicas, entre otros, para el desarrollo, fabricación y uso de una nueva clase de productos farmacéuticos, que incluyen, pero no se limitan a, novedosos fármacos, productos biológicos, de diagnóstico, terapéuticos y profilácticos.

El descubrimiento de nucliones y las realizaciones de la presente invención son sorprendentes por varios motivos. Hasta ahora, no se había informado o reivindicado estructura biológica en la que una molécula de ácido nucleico fuera encapsulada por una cáscara polimérica de otras moléculas de ácido nucleico. Aunque hay un organismo científico que describe cómo ciertas proteínas forman cápsides poliméricas alrededor de ácidos nucleicos (particularmente en virus), no se han publicado informes de que los ácidos nucleicos formen tales cáscaras.

Un segundo hallazgo sorprendente es que las moléculas de ARN de transferencia desempeñan una función mucho mayor en la biología evolutiva y moderna que lo que era previamente entendido. En los más de cincuenta años desde que su existencia fue postulada por primera vez por Francis Crick (Crick, 1957, A Note for the RNA Tie Club, sin publicar; Crick, 1958, Symp. Soc. Exp. Biol., 12:138) y fueron desveladas en el laboratorio de Paul Zamecnik (Hoagland et al., 1958, J. Biol. Chem., 231:241), las moléculas de ARN de transferencia ha sido normalmente descritas como adaptadores moleculares para traducir la información en ARN mensajero (ARNm) en proteínas. En la síntesis de proteínas, cada ARNt se carga con un aminoácido específico y entra en el ribosoma, tras lo cual el ARNt cargado se une a un codón de correspondencia en el ARNm y la cadena de polipéptidos en crecimiento en el ARNt previo se transfirió al aminoácido en la molécula de ARNt entrante.

El descubrimiento de nucliones y varias realizaciones de la presente invención han revelado las siguientes propiedades y funciones biológicas adicionales del ARN de transferencia, que no han sido previamente informadas:

1. Las moléculas de ARN de transferencia se unen al ARN mensajero en ausencia de ribosomas, formando una o más ribocápsides poliméricas alrededor del ARNm; la estructura cuaternaria resultante es un nuclión de ARNt.
2. En cada ribocápside, ARNt adyacentes se unen directamente juntos mediante sitios de unión intermoleculares que están sustancialmente conservados en la mayoría de los ARNt en todos los dominios biológicos.
3. La función primaria de la secuencia de ARNt conservada G53-T54-P55-C56 es servir de sitio de enlace del ARN de transferencia ('TLS'), no de un sitio de unión al ribosoma como se había creído previamente (Phillips, 1969, Nature, 223:347); el TLS normalmente se une a la cola CCA del ARNt adyacente (el conector de ARNt o 'TC').
4. Ciertos ARNt iniciadores tienen sitios TLS o TC modificados, que bloquean los enlaces TLS-TC y desencadenan la terminación del nuclión para marcar codones de iniciación de la traducción mientras que se asegura el correcto registro del marco; el nuclión resultante se llama un 'nuclión de iniciación'.
5. ARNt iniciadores interaccionan con estructuras de marcador de ARNm definidas, tales como la secuencia de Shine-Dalgarno, para registrar y estabilizar nucliones de iniciación.
6. Los nucliones almacenan ARNt cargados listos para la síntesis de proteínas; esta precarga de almacenamiento mejora la logística de traducción, acelerando tanto la obtención como la administración de ARNt cargados.
7. Los nucliones estabilizan los enlaces químicos de alta energía, pero lábiles, entre los ARNt y sus aminoácidos, conservando la energía que de otro modo sería desaprovechada; en efecto, el nuclión de ARNt es una batería.

8. Ciertos nucleones de ARNt se unen a factores de elongación de proteína tales como EF-Tu y eEF1A, que transportan los ARNt cargados del almacén de nucleones a la fábrica de ribosomas para la síntesis de proteínas.

9. Al menos uno de los nucleósidos de TLS en los ARNt modernos (ribosiltimina en la posición 54) ha evolucionado, entre otras cosas, para minimizar la síntesis no ribosómica de proteínas, pero ciertas mutaciones generan ARNt con la disposición primordial de pseudouridina en la posición 54; estos inversores están asociados a transformaciones celulares implicadas en ciertos cánceres.

10. Ciertos virus, que incluyen algunos o todos los retrovirus, falsifican las estructuras de nucleón y ribocápside, supuestamente para evadir los sistemas de control biológico normal y se apropian de la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula.

11. Las fuerzas termodinámicas solas pueden conducir ciertos nucleones a conformaciones en etapas con estados de energía progresivamente más bajos, proporcionando la mecánica y potencia para un motor helicoidal; en el mundo del ARN primordial, los motores de ARN helicoidal fueron los pioneros de la síntesis de proteínas antes de la llegada de los ribosomas.

12. Los primeros ribosomas resultaron de la fusión de dos subunidades de ribocápside; el centro de transferencia de peptidilo en ribosomas modernos evolucionó a partir de dos bucles de pseudouridina de ARNt que alinean las colas CCA de los ARNt de aminoácido y peptidilo en los sitios A y P del ribosoma.

El reconocimiento de que los ancestros tempranos de ARNt fueron subunidades de ribocápside resuelve uno de los mayores misterios en la biología molecular, el origen de la síntesis de proteínas ('traducción'). Como Wolf y Koonin establecieron (Wolf et al., 2007, *Biology Direct*, 2:14): 'El origen del sistema de traducción es, discutiblemente, el problema central y más difícil en el estudio del origen de la vida, y uno de los más difíciles en toda la biología evolutiva. El problema tiene un claro aspecto de callejón sin salida: la alta fidelidad de la traducción difícilmente puede lograrse sin un complejo conjunto altamente evolucionado de ARN y proteínas, pero no podría evolucionar una elaborada maquinaria de proteínas sin un sistema de traducción preciso.'

Dicho de otro modo, una cuestión de biología molecular crucial durante los últimos 50 años ha sido: ¿los genes o las proteínas? La sorprendente respuesta a esta evidente paradoja es ninguno. Los ARN de ribocápside primordiales, los ancestros del ARNt moderno, fueron primero. El modelo estructural de nucleón nos enseña que la selección darwiniana en un mundo de ARN condujo a la evolución de genes de ARN que se unen a ARN de ribocápside particulares (no aminoácidos), los ARN de ribocápside evolucionaron entonces como adaptadores moleculares para unirse a aminoácidos (la superficie de ribocápside modificada confirió una ventaja selectiva con respecto al nucleón), y posteriormente un motor helicoidal de ARN dio luz a la síntesis de proteínas. Los ribosomas evolucionaron después de la fusión de dos ARN de ribocápside. Esta percepción inesperada explica varias diferencias médicamente importantes entre los reinos biológicos (por ejemplo, diferencias sustanciales en el inicio de la traducción) y soporta el uso de la nueva plataforma tecnológica descrita en el presente documento para el diseño, desarrollo, fabricación y utilización de productos, procesos y servicios médicos e industriales mejorados que hacen uso de estas diferencias (por ejemplo, el diseño, desarrollo, fabricación y uso de nuevos fármacos antibióticos y antivirales).

Las estructuras de nucleón y los métodos de fabricación descritos en el presente documento son sorprendentes para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el rendimiento de los nucleones fabricados a 37 °C es sustancialmente más alto que el rendimiento de los nucleones observados con el mismo procedimiento de fabricación a 8 °C. Este rendimiento más alto es ahora atribuible, entre otras cosas, a la termodinámica sinérgica asociada a la estructura cuaternaria de nucleones. Pero, antes de la llegada de la tecnología de nucleones enseñada por la presente invención, este fenómeno técnico no podría ser predicho, y no era predicho, por biólogos moleculares generalmente acostumbrados a observar estructuras terciarias de ácido nucleico que se despliegan y desestabilizan al aumentar la temperatura.

#### Definiciones

En cualquier lugar donde se empleen las siguientes palabras y frases en el presente documento, deben tener los significados definidos en esta sección, independientemente de si los caracteres iniciales están o no en mayúsculas, la palabra o frase se usa en el singular o plural, o se emplea un tiempo diferente. En el caso de conflicto entre una definición en esta sección y cualquier otra definición, entendimiento o implicación en el presente documento, entonces deberá controlarse la definición en esta sección. En cualquier lugar donde una reivindicación use una palabra o frase definida en esta sección, entonces tal palabra o frase debe interpretarse según la definición en esta sección, junto con toda y cada uno de la información adicional no en conflicto en el presente documento que se refiere a tal palabra o frase.

Aminoácido: Como se usa en el presente documento, el término 'aminoácido' puede referirse a cualquier compuesto y/o sustancia que puede incorporarse en una cadena de polipéptidos. Un aminoácido tiene la estructura general

$H_2N-C(H)(R)-COOH$ . Un aminoácido puede ser un aminoácido que existe de forma natural. Un aminoácido puede ser un aminoácido sintético; un aminoácido puede ser un D-aminoácido; un aminoácido puede ser un L-aminoácido.

5 'Aminoácido estándar' o 'aminoácido natural' se refiere a cualquiera de los veinte L-aminoácidos estándar comúnmente encontrados en péptidos que existen de forma natural. 'Aminoácido no estándar' se refiere a cualquier aminoácido, distinto de los aminoácidos estándar, independientemente de si se preparan sintéticamente o se obtienen de una fuente natural. Como se usa en el presente documento, 'aminoácido no natural' engloba aminoácidos químicamente producidos o modificados, que incluyen, pero no se limitan a, sales, derivados de aminoácido (tales como amidas) y/o sustituciones. Los aminoácidos, que incluyen aminoácidos de extremo carboxi  
10 y/o amino en péptidos, pueden modificarse por metilación, amidación, acetilación y/o sustitución con otros grupos químicos que pueden cambiar la semivida en circulación del péptido sin afectar adversamente su actividad. Los aminoácidos pueden participar en un enlace disulfuro y otros enlaces intramolecular e intermoleculares. El término 'aminoácido' se usa indistintamente con 'resto de aminoácido' y puede referirse a un aminoácido libre, un resto de aminoácido de un péptido o un aminoácido conjugado, conectado o unido a un ácido nucleico, ribocápside, nuclión o un componente del mismo. Será evidente del contexto en el que el término se usa si se refiere a un aminoácido libre,  
15 un residuo de un péptido o un aminoácido conectado a un ácido nucleico, ribocápside, nuclión o un componente del mismo.

20 Asociación: Como se usa en el presente documento, los términos 'asociación' y 'asociado a' se refiere al estado de dos o más entidades, que están conectadas por cualquier interacción covalente o no covalente directa o indirecta. Una asociación puede ser covalente. Una asociación covalente puede estar mediada por un resto de conector. Una asociación puede ser no covalente (por ejemplo, interacciones de carga, interacciones de afinidad, coordinación metálica, adsorción física, interacciones hospedador-huésped, interacciones hidrófobas, interacciones de apilamiento  $\pi$ , interacciones de enlace de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones magnéticas,  
25 interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, etc.).

Nuclión básico: Como se usa en el presente documento, el término 'nuclión básico' se refiere a un nuclión que no tiene una envuelta de nuclión. El término 'parte de nuclión básico' se refiere a una parte del nuclión dentro de la(s) envuelta(s) de nuclión del nuclión. En particular, parte de nuclión básico no incluye ninguna envuelta de nuclión.  
30

Unido (o unir o enlace): Como se usa en el presente documento, los términos 'unido', 'unir', 'se une' y 'enlace' se refieren a la asociación o conexión de dos o más átomos, sustancias químicas, moléculas, macromoléculas, complejos, agregados, quelatos, sustancias, materiales o superficies por cualquier interacción física, química, covalente, no covalente, iónica, electrostática, entrópica, de enlace de hidrógeno, apilamiento, dipolo-dipolo,  
35 disolvente, van der Waals, carga, afinidad, coordinación metálica, adsorción física, hospedador-huésped, hidrófoba, apilamiento de bases, térmica, magnética u otra interacción, por cualquier combinación de las mismas, o por cualquier híbrido de los mismos.

40 Ácido nucleico de núcleo: Como se usa en el presente documento, el término 'ácido nucleico de núcleo' se refiere a una composición que es principalmente ácido nucleico, e incluye un medio de unión de dicha composición a al menos una ribocápside. 'Ácido nucleico de núcleo' puede referirse a una composición tal que puede unirse solo a una ribocápside. 'Ácido nucleico de núcleo' puede referirse a una composición tal que puede unirse a dos o más ribocápsides

45 Preparación de ácido nucleico de núcleo: Como se usa en el presente documento, una 'preparación de ácido nucleico de núcleo' es una composición (no un método o proceso) que se refiere a una preparación de un miembro seleccionado del grupo que comprende un ácido nucleico de núcleo natural, un ácido nucleico de núcleo no natural, ácidos nucleicos de núcleo naturales, ácidos nucleicos de núcleo no naturales, ácidos nucleicos de núcleo homogéneos, ácidos nucleicos de núcleo heterogéneos, una solución de cualquier miembro de este grupo, una  
50 forma sólida de cualquier miembro de este grupo, una forma líquida de cualquier miembro de este grupo, una forma de aerosol de cualquier miembro de este grupo, una formulación de cualquier miembro de este grupo, una mezcla que contiene cualquier miembro de este grupo, cualquier mezcla de dos o más miembros de este grupo, cualquier combinación de dos o más miembros de este grupo, y cualquier híbrido de dos o más miembros de este grupo.

55 Nuclión con envuelta: Como se usa en el presente documento, el término 'nuclión con envuelta' se refiere a un nuclión que está encerrado, recubierto, rodeado, enfundado, protegido, envasado, cubierto, tratado, encapsulado o asociado en su totalidad, en parte o partes por o con una o más envueltas de nuclión.

60 Preparación de nuclión con envuelta: Como se usa en el presente documento, una 'preparación de nuclión con envuelta' es una composición (no un método o proceso) que se refiere a una preparación de nuclión que contiene uno o más nucliones con envuelta.

65 Preparación de nuclión de ARNt con envuelta: Como se usa en el presente documento, una 'preparación de nuclión con envuelta' es una composición (no un método o proceso) que se refiere a una preparación de nuclión que contiene uno o más nucliones de ARNt con envuelta.

Ribocápside con envuelta: Como se usa en el presente documento, el término 'ribocápside con envuelta' se refiere a una ribocápside que está encerrada, recubierta, cubierta, tratada, encapsulada o asociada en su totalidad, en parte o partes por o con una envuelta, que incluye, pero no se limita a, una envuelta de nuclión.

5 Nuclión de ARNt con envuelta: Como se usa en el presente documento, el término 'nuclión de ARNt con envuelta' se refiere a un nuclión de ARNt que está encerrado, recubierto, rodeado, enfundado, protegido, envasado, cubierto, tratado, encapsulado o asociado en su totalidad, en parte o partes por o con una o más envueltas de nuclión.

10 Homogéneo: Como se usa en el presente documento, el término 'homogéneo' se refiere al grado de uniformidad en una o más características predefinidas (que incluye, pero no se limita a, composición, estructura, disposición, secuencia, conformación, u otro parámetro) de una preparación, solución, producto intermedio, producto, extracto, aislado, fracción, mezcla, o una población de moléculas, complejos o estructuras (por ejemplo, una población de ribocápsides o subunidades de ribocápside en nucliones). Una población de composiciones puede considerarse que es 'homogénea' si las composiciones son al menos el 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %,  
15 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % idénticas con respecto a una característica tal. Una población de composiciones puede considerarse que es 'homogénea' si, con respecto a una característica, las composiciones son al menos el 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % distintas de las composiciones en la misma clase de composiciones. Por ejemplo, una preparación de nucliones de ARNt puede considerarse que es 'homogénea' si al menos el 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % de los nucliones en la preparación tiene sustancialmente la misma relación predefinida de moléculas de subunidad de ribocápside de ARNt con respecto a moléculas de ácido nucleico de núcleo.

25 Heterogéneo: Como se usa en el presente documento, el término 'heterogéneo' se refiere a una falta de homogeneidad con respecto a una o más características predefinidas (que incluyen, pero no se limitan a, composición, estructura, disposición, secuencia, conformación, u otro parámetro) de una preparación, solución, producto intermedio, producto, extracto, aislado, fracción, mezcla, o una población de moléculas, complejos o estructuras.

30 Homología: Como se usa en el presente documento, los términos 'homología' y 'homólogo' se refieren a la relación global entre macromoléculas biológicas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptido. Como se usa en el presente documento, el término 'homólogo' es una composición que es homóloga a otra composición. Puede considerarse que las macromoléculas son 'homólogas' si la estructura terciaria de las macromoléculas está sustancialmente relacionada. Por ejemplo, se  
35 considera que todas las moléculas de ARN de transferencia son estructuralmente homólogas debido a su estructura con forma de L global, independientemente de las diferencias estructurales entre ARNt individuales. Puede considerarse que las macromoléculas son 'homólogas' si la estructura terciaria del esqueleto de las macromoléculas (por ejemplo, el esqueleto de fosfodiéster de algunos ácidos nucleicos) está sustancialmente relacionada. Puede considerarse que las macromoléculas son 'homólogas' entre sí si sus secuencias son al menos el 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % idénticas. Puede considerarse que las macromoléculas son 'homólogos' entre sí si sus secuencias son al menos el 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % similares. La sustitución de una pirimidina con otra pirimidina, o una purina con otra purina, puede mantener el mismo grado de homología. Puede considerarse que la sustitución de una base no modificada con una base modificada, una base modificada con una base no modificada, o una base modificada con una base modificada diferente, todos en los que la base principal sigue siendo la misma, mantiene el mismo grado de homología.

50 Identidad: Como se usa en el presente documento, el término 'identidad' se refiere a la relación global entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptido. El cálculo del porcentaje de identidad de dos secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, puede realizarse alineando las dos secuencias para fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencias de ácidos nucleicos para alineamiento óptimo y pueden ignorarse secuencias no idénticas para fines de comparación). La longitud de una secuencia alineada para fines de comparación puede ser al menos el 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o el 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Entonces se comparan los nucleótidos en posiciones de nucleótido correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo nucleótido como la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las  
55 secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesita ser introducido para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden llevarse a cabo usando un algoritmo matemático.

65 Nuclión de iniciación: Como se usa en el presente documento, los términos 'nuclión de iniciación' y 'nuclión iniciador' se refieren a un nuclión que comprende (i) al menos una parte de un ARN mensajero como ácido nucleico de núcleo, y (ii) una o más ribocápsides y/o dos o más subunidades de ribocápside unidas a dicho ARNm en o cerca de

un codón de iniciación en dicho ARNm. Dichas ribocápsides y/o subunidades de ribocápside del nuclión de iniciación pueden comprender además un medio para unirse a una estructura de marcador de iniciación en dicho ARNm, que incluye, pero no se limita a, una secuencia de Shine-Dalgarno o de Kozak. Dichas ribocápsides y/o subunidades de ribocápside del nuclión de iniciación pueden comprender además un medio para unirse a un ribosoma. El ácido nucleico de núcleo del nuclión de iniciación puede comprender una secuencia de unión de ribocápside y/o secuencia de unión de subunidad de ribocápside operativamente unida al codón de iniciación en el ARNm. El término 'operativamente unido a' se refiere a la relación funcional de una estructura biológica, composición, componente o actividad con otra estructura biológica, composición, componente o actividad. 'Operativamente unido a' puede referirse a la relación funcional de un nuclión, ribocápside, subunidad de ribocápside o ácido nucleico de núcleo con otra secuencia de ácidos nucleicos, otra estructura de ácido nucleico, o una actividad biológica.

Aislamiento: Como se usa en el presente documento, 'aislamiento', 'aislar', 'aislado' y 'distinto' se refieren al proceso, acto o estado, respectivamente, en el que una mezcla de partida que contiene una sustancia, composición, estructura, información o entidad se convierte en dos o más fracciones o mezclas, en al menos una de las que la sustancia, composición, estructura, información o entidad está enriquecida. Como se usa en el presente documento, 'en forma aislada' significa que la sustancia, composición, estructura, información o entidad está aislada con respecto a su estado o contexto previo. Cuando se aplica a una subestructura, el término 'en forma aislada' puede referirse a una porción de una estructura que está informativamente o físicamente aislada o distinta de la estructura de envoltura. Además, como se usa en el presente documento, un 'nuclión aislado' pretende significar un nuclión que ha sido completamente o parcialmente sacado de su entorno nativo. Por ejemplo, los nucliones que han sido sacados o purificados de células se consideran aislados. Además, un nuclión que se encuentra en una célula, tejido o matriz el que normalmente no se forma o encuentra también se considera 'aislado' para los fines de la presente invención. Similarmente, los nucliones que han sido sintetizados se consideran que son nucliones aislados. Los nucliones sintéticamente producidos contenidos en células hospedadoras se consideran aislados para los fines de la presente invención. 'Purificado,' por otra parte, es bien entendido en la materia y generalmente significa que los nucliones están sustancialmente libres de material celular, componentes celulares, precursores químicos u otras sustancias químicas más, quizás, tampón o disolvente. 'Sustancialmente libre' no pretende significar que otros componentes más allá de los nucliones novedosos sean indetectables. Los nucliones de la presente invención pueden estar aislados o purificados.

La mayoría (o principalmente): Como se usa en el presente documento, los términos 'la mayoría' y 'principalmente' significan más del 50 %, que incluyen, pero no se limitan a, más del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % y el 99,9 %, y que incluyen el 100 %.

ARNt nativo: Como se usa en el presente documento, el término 'ARNt nativo' se refiere a ARN de transferencia que tiene estructura y/o componentes sustancialmente similares u homólogos a aquellos encontrados en ARNt natural, a condición de que el ARNt nativo pueda ser ARNt natural o ARNt no natural como se define por separado.

Ácido nucleico: Como se usa en el presente documento, el término 'ácido nucleico' se refiere a un polímero u oligómero de nucleótidos. Los términos 'ácido nucleico' y 'polinucleótido' pueden usarse indistintamente. 'Ácido nucleico' puede englobar ARN y ADN. Los términos 'ácido nucleico' y 'polinucleótido' incluyen ARN mono y/o bicatenario, ADN e híbridos de los mismos. Además, los términos 'ácido nucleico', 'ADN', 'ARN' y/o términos similares incluyen análogos de ácido nucleico, por ejemplo, análogos que tienen esqueleto distinto de un fosfodiéster. Por ejemplo, los denominados 'ácidos nucleicos peptídicos', que son conocidos en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en el esqueleto, están considerados dentro del alcance de la presente invención. El término 'secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos' incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y/o codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y/o ARN pueden incluir intrones. Los ácidos nucleicos pueden purificarse a partir de fuentes naturales, producirse usando sistemas de expresión recombinante y purificarse opcionalmente, sintetizarse químicamente, etc. Cuando corresponda, por ejemplo, en el caso de moléculas químicamente sintetizadas, los ácidos nucleicos pueden comprender análogos de nucleótidos tales como análogos que tienen bases o azúcares químicamente modificados, modificaciones del esqueleto, etc. El término 'secuencia de ácidos nucleicos', como se usa en el presente documento, puede referirse al propio material de ácido nucleico y no está limitado a la información de secuencia (por ejemplo, la sucesión de letras elegidas, por ejemplo, entre las cinco letras de bases A, G, C, T o U) que caracteriza bioquímicamente un ácido nucleico específico, por ejemplo, una molécula de ADN o de ARN. Una secuencia de ácidos nucleicos se presenta en la dirección 5' a 3', a menos que se indique lo contrario. Un 'ácido nucleico' o 'polinucleótido' puede comprender nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina); análogos de nucleósido (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metiladenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina y 2-tiocitidina); bases químicamente modificadas; bases biológicamente modificadas (por ejemplo, bases metiladas, pseudouridina); bases intercaladas; monómeros de ácido nucleico bloqueado; azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa, hexosa, y un resto de ribosa modificado con un puente que conecta el oxígeno de 2' y el carbono de 4'); y/o grupos fosfato modificados (por ejemplo, fosforotioatos y enlaces de 5'-N-fosforamidito). Como se

usa en el presente documento, los términos 'ácido nucleico' y 'polinucleótido' también incluyen cualquier cadena de nucleótidos natural o no natural que incluye, pero no se limita a, todas y cada una de las modificaciones, derivados, conjugados, variantes, deleciones, conformaciones, estructuras, simetrías, hélices, ramificaciones, isómeros, quirales, isótopos, análogos, equivalentes, sustituciones, combinaciones, sustitutos, equivalentes funcionales, sustituciones funcionales, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados, precursores, ancestros, sucesores, descomposiciones, versiones sintéticas, armazones artificiales y otras composiciones de una cadena tal o sus nucleótidos, cualquier combinación de dos o más de los mismos, y cualquier híbrido de dos o más de los mismos.

5 Nucleósido: El término 'nucleósido' puede referirse a una glucosilamina natural que comprende una nucleobase (frecuentemente denominada frecuentemente una 'base') unida a un azúcar (normalmente una ribosa o 2'-desoxirribosa) mediante un enlace covalente (normalmente un enlace beta-glucosídico). El término 'nucleósido' puede referirse a una versión no natural, modificación, sustituto o equivalente de un nucleósido natural. El término 'nucleósido' generalmente excluye el resto de conector (por ejemplo, un enlace fosfodiéster) que conecta nucleótidos adyacentes en un ácido nucleico.

10 Nucleótido: El término 'nucleótido' en el presente documento puede referirse a una composición natural que comprende una nucleobase (frecuentemente denominada simplemente una 'base') unida a un azúcar (normalmente una ribosa o 2'-desoxirribosa) mediante un enlace covalente (normalmente un enlace beta-glucosídico), en el que el azúcar está covalentemente unido (normalmente mediante su sitio de carbono 5, aunque algunas veces mediante su carbono 2 o carbono 3) a un grupo fosfato. El término 'ribonucleótido' se refiere a un nucleótido donde el azúcar es ribosa, y el término 'desoxirribonucleótido' se refiere a un nucleótido donde el azúcar es desoxirribosa. Los nucleótidos naturales pueden contener ya sea una base de purina o una de pirimidina. El término 'nucleótido' puede referirse a una versión no natural, modificación, sustituto o equivalente de un nucleótido natural. El término 'nucleótido' generalmente incluye el resto de conector (por ejemplo, un enlace fosfodiéster) que conecta nucleótidos adyacentes en un ácido nucleico. El resto de conector entre nucleótidos adyacentes en un ácido nucleico puede comprender cualquier mecanismo químico para conectar los nucleótidos y no tiene que ser un enlace fosfodiéster.

20 Nuclión: Como se usa en el presente documento, el término 'nuclión' se refiere a una composición que comprende (i) un ácido nucleico de núcleo, y (ii) una o más ribocápsides que comprenden cada una un polímero de dos o más subunidades de ribocápside, en el que dichas subunidades de ribocápside comprenden ácido nucleico. Como se describe en el presente documento, (a) la mayoría de las subunidades de ribocápside pueden unirse a al menos una parte del ácido nucleico de núcleo, y (b) la mayoría de las subunidades de ribocápside están unidas a al menos una parte de una o más subunidades de ribocápside adyacentes. El término 'nuclión' se refiere a una composición tal que puede o puede no comprender además una o más envueltas de nuclión. El término 'nuclión' puede referirse a una composición tal sin una envuelta de nuclión (un 'nuclión básico'). El término 'nuclión' puede referirse a una composición tal con una o más envueltas de nuclión (un 'nuclión con envuelta'). El término 'nuclión' puede referirse a un nuclión de ARNt. El término 'nuclión' puede referirse a un tipo de nuclión distinto de un nuclión de ARNt. El término 'nuclión' puede referirse a todos los tipos de nuclión, con o sin una o más envueltas de nuclión. El término 'nuclión' puede referirse a una preparación de nuclión. El término 'nuclión' puede referirse a una preparación de nuclión con envuelta.

30 Componente de nuclión: Como se usa en el presente documento, el término 'componente de nuclión' se refiere a un miembro seleccionado del grupo que consiste en una subunidad de ribocápside, una ribocápside, un ácido nucleico de núcleo, una envuelta de nuclión, una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo, y un híbrido de cualesquiera dos o más miembros de este grupo.

35 Dispositivo de nuclión: Como se usa en el presente documento, el término 'dispositivo de nuclión' se refiere a una composición que comprende un nuclión y un medio para que tal nuclión funcione como un dispositivo. Tal dispositivo puede ser un dispositivo mecánico o una máquina. Tal dispositivo puede ser un dispositivo químico. Tal dispositivo puede ser un medio para la manipulación, procesamiento o almacenamiento de información.

40 Envuelta de nuclión: Como se usa en el presente documento, el término 'envuelta de nuclión' se refiere a una composición que comprende (i) una envuelta, cáscara, cierre, capa, película, superficie, envoltura, recubrimiento, camisa, protección, revestimiento, cubierta, tratamiento, encapsulación, una combinación de cualesquiera dos o más de los anteriores, o un híbrido de cualesquiera dos o más de los anteriores, y (ii) un medio de unión de dicha composición a la totalidad, una parte o partes de un nuclión sin una envuelta de nuclión, o a la totalidad, una parte o partes de uno o más componentes de nuclión. Tal composición puede comprender además un artículo seleccionado del grupo que consiste en un átomo, metal, molécula, macromolécula, molécula natural, molécula no natural, molécula biológica, macromolécula biológica, proteína, enzima, factor de elongación, factor de iniciación, sintetasa, anticuerpo, hapteno, ácido nucleico, aptámero, ribozima, lípido, fosfolípido, hidrato de carbono, sustancias químicas, conjugado, molécula de señalización, hormona, componente celular, componente del cuerpo, componente de tejido, antígeno, sustancia inmunitaria, complejo, agregado, material, sustancia natural, sustancia no natural, agente de obtención de imágenes, agente farmacéutico, agente terapéutico, agente de diagnóstico, agente profiláctico, estructura ternaria, producto radiofarmacéutico, sustancia radiactiva, quelato, mezcla, superficie, partícula, vesícula,



cápsula, píldora, pegamento, excipiente, adyuvante, coloide, película, una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo, y un híbrido de cualesquiera dos o más miembros de este grupo.

5 Envuelta de preparación de nuclión: Como se usa en el presente documento, una 'preparación de envuelta de  
nuclión' es una composición (no un método o proceso) que se refiere a una preparación de un miembro  
seleccionado del grupo que comprende una envuelta de nuclión natural, una envuelta de nuclión no natural,  
10 envueltas de nuclión naturales, envueltas de nuclión no naturales, envueltas de nuclión homogéneas, envueltas de  
nuclión heterogéneas, una solución de cualquier miembro de este grupo, una forma sólida de cualquier miembro de  
este grupo, una forma líquida de cualquier miembro de este grupo, una forma de aerosol de cualquier miembro de  
este grupo, una formulación de cualquier miembro de este grupo, una mezcla que contiene cualquier miembro de  
este grupo, cualquier mezcla de dos o más miembros de este grupo, cualquier combinación de dos o más miembros  
de este grupo, y cualquier híbrido de dos o más miembros de este grupo.

15 Preparación de nuclión: Como se usa en el presente documento, una 'preparación de nuclión' es una composición  
(no un método o proceso) que se refiere a una preparación de un miembro seleccionado del grupo que comprende  
un nuclión natural, un nuclión no natural, un nuclión con envuelta natural, un nuclión con envuelta no natural,  
nucliones naturales, nucliones no naturales, nucliones con envuelta naturales, nucliones con envuelta no naturales,  
20 nucliones homogéneos, nucliones heterogéneos, nucliones con envuelta homogéneos, nucliones con envuelta  
heterogéneos, un nuclión natural de ARNt, un nuclión no natural de ARNt, un nuclión de ARNt con envuelta natural,  
un nuclión de ARNt con envuelta no natural, nucliones de ARNt naturales, nucliones de ARNt no naturales, nucliones  
de ARNt con envuelta naturales, nucliones de ARNt con envuelta no naturales, nucliones de ARNt homogéneos,  
nucliones de ARNt heterogéneos, nucliones de ARNt con envuelta homogéneos, nucliones de ARNt con envuelta  
25 heterogéneos, una solución de cualquier miembro de este grupo, una forma sólida de cualquier miembro de este  
grupo, una forma líquida de cualquier miembro de este grupo, una forma de aerosol de cualquier miembro de este  
grupo, una formulación de cualquier miembro de este grupo, una mezcla que contiene cualquier miembro de este  
grupo, cualquier mezcla de dos o más miembros de este grupo, cualquier combinación de dos o más miembros de  
este grupo, y cualquier híbrido de dos o más miembros de este grupo.

30 Diana de nuclión: Como se usa en el presente documento, el término 'diana de nuclión' se refiere a una composición  
que comprende una subestructura de nuclión y un medio para prevenir, promover, cambiar o alterar la estructura,  
función o actividad de un nuclión; en la que una subestructura de nuclión comprende una porción predefinida de la  
estructura de un nuclión, sus componentes, o cualquier combinación de tales componentes. Tal porción predefinida  
de la estructura puede seleccionarse del grupo que consiste en una estructura primaria, una estructura secundaria,  
35 una estructura terciaria, una estructura cuaternaria, una estructura con forma de R, una estructura con forma de S,  
una estructura con forma de T, una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo, y un híbrido  
de cualesquiera dos o más miembros de este grupo.

Rendimiento de nucliones: Como se usa en el presente documento, el término 'rendimiento de nucliones' se refiere  
40 al porcentaje de ácido nucleico de núcleo que se convierte en nucliones durante el ensamblaje de nucliones.

Oligómero (u oligomérico): Como se usa en el presente documento, los términos 'oligómero' y 'oligomérico' se  
refieren a un conjunto de subunidades de repetición, que está limitado en longitud, en el que la mayoría de las  
subunidades tienen homología estructural suficiente para la integridad del oligómero. La mayoría de las subunidades  
45 pueden tener uno o más medios para unirse a una subunidad adyacente, una molécula de núcleo, o ambos. Este  
medio puede ser un enlace no covalente. Este medio puede ser un enlace covalente. Este medio puede ser una  
combinación de enlaces no covalentes y covalentes.

Polímero (o polimérico): Como se usa en el presente documento, los términos 'polímero' y 'polimérico' se refieren a  
un conjunto de subunidades de repetición, que en principio está ilimitado en longitud, en el que la mayoría de las  
subunidades tienen homología estructural suficiente para la integridad del oligómero. La mayoría de las subunidades  
50 pueden tener uno o más medios para unirse a una subunidad adyacente, una molécula de núcleo, o ambos. Este  
medio puede ser un enlace no covalente. Este medio puede ser un enlace covalente. Este medio puede ser una  
combinación de enlaces no covalentes y covalentes. Como se usa en el presente documento, los términos 'polímero'  
y 'polimérico' también se refieren a oligómero y oligomérico, respectivamente.

55 Topograma de prevalencia: Como se usa en el presente documento, el término 'topograma de prevalencia' se refiere  
a una presentación de (i) información estadística referente a la composición de un objeto, en (ii) una representación  
tridimensional de ese objeto. 'Topograma de prevalencia' y 'topograma de prevalencia de nucleótidos' se refieren  
en el presente documento a una presentación de datos de prevalencia de nucleósidos en la estructura terciaria de una  
60 molécula de ARN de transferencia.

Secuencia de marcador de síntesis de proteínas: Como se usa en el presente documento, el término 'secuencia de  
marcador de síntesis de proteínas' se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos en ARN mensajero que está (i) en  
la dirección 5' de, en la dirección 3' de, o comprende, un codón de iniciación, y (ii) está operativamente unido a la  
65 iniciación, terminación, promoción, inhibición o control de la síntesis de proteínas. Por ejemplo, la secuencia de

marcador de síntesis de proteínas incluye, pero no se limita a, una secuencia de Shine-Dalgarno y una secuencia de Kozak.

5 Puro: Como se trata anteriormente, una sustancia o entidad es 'pura' o 'está purificada' si está sustancialmente libre de otros componentes. Por ejemplo, una preparación que contiene más de aproximadamente el 90 % de una particular y/o entidad sustancia normalmente se considera que es una preparación pura. Una sustancia y/o entidad puede ser al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 99,9 % pura.

10 Ribocápside: Como se usa en el presente documento, el término 'ribocápside' se refiere a un oligómero o polímero de dos o más subunidades de ribocápside, en el que dicho oligómero o polímero incluye un medio para la unión de dicho oligómero o polímero a la totalidad, una parte, o partes, de un ácido nucleico de núcleo. El término 'ribocápside' puede referirse a un conjunto de subunidades de ribocápside adyacentes contiguas unidas a un ácido nucleico de núcleo. Un nuclión puede contener una, dos o más ribocápsides, que reflejan el número de oligómeros o  
15 polímeros de subunidades de ribocápside que están unidos a un único ácido nucleico de núcleo.

Subunidad de ribocápside: Como se usa en el presente documento, una subunidad de ribocápside se refiere a una composición que es principalmente ácido nucleico, en la que tal composición tiene un medio para la unión de dicha composición a un ácido nucleico de núcleo, y también tiene un medio para la unión de dicha composición a al menos  
20 una subunidad de ribocápside adyacente unida al mismo ácido nucleico de núcleo. Para evitar dudas, una subunidad de ribocápside no es un único nucleótido o nucleósido.

Preparación de subunidad de ribocápside: Como se usa en el presente documento, una 'preparación de subunidad de ribocápside' es una composición (no un método o proceso) que se refiere a una preparación de un miembro seleccionado del grupo que comprende una subunidad de ribocápside natural, una subunidad de ribocápside no natural, subunidades de ribocápside naturales, subunidades de ribocápside no naturales, subunidades de ribocápside homogéneas, subunidades de ribocápside heterogéneas, una solución de cualquier miembro de este grupo, una forma sólida de cualquier miembro de este grupo, una forma líquida de cualquier miembro de este grupo, una forma de aerosol de cualquier miembro de este grupo, una formulación de cualquier miembro de este grupo, una  
25 mezcla que contiene cualquier miembro de este grupo, cualquier mezcla de dos o más miembros de este grupo, cualquier combinación de dos o más miembros de este grupo, y cualquier híbrido de dos o más miembros de este grupo.

Simetría: Como se usa en el presente documento, los términos 'simetría' y 'simétrico' se refieren a simetría geométrica en un subgrupo del grupo euclídeo de isometrías en el espacio euclídeo bi o tridimensional. Estas isometrías consisten en reflexiones, rotaciones, traslaciones y cualquier combinación de estas operaciones geométricas básicas. La simetría helicoidal es un ejemplo de una simetría que combina una rotación con una traslación. Por ejemplo, subunidades de ribocápside sustancialmente compuestas de ARNt pueden disponerse en un nuclión de ARNt de forma S, en el que, en algunas realizaciones, estas subunidades presentan simetría helicoidal  
35 alrededor de un eje de núcleo a través del ácido nucleico de núcleo. Como se usa en el presente documento, los términos 'asimetría' y 'asimétrico' se refieren a la ausencia de simetría.

ARN de transferencia: Un experto en la técnica de la biología molecular ha entendido previamente que los términos 'ARN de transferencia' y 'ARNt' generalmente significan un ácido ribonucleico que funciona como un adaptador molecular para traducir el código genético en ARN mensajero en polímeros de aminoácidos en proteínas, y que esta traducción normalmente se produce en un ribosoma. Como se usa en el presente documento, los términos 'ARN de transferencia' y 'ARNt' se refieren a un miembro seleccionado del grupo que comprende un ARNt sin un aminoácido unido (un 'ARNt no cargado'), un ARNt con un aminoácido unido a su cola CCA (un 'ARNt cargado'), un ARNt con un aminoácido unido a una localización distinta de su cola CCA, un ARNt modificado, un ARNt seleccionado, un ARNt natural, un ARNt no natural, un ARNt de arquea, un ARNt bacteriano, un ARNt viral, un ARNt de plástido, un ARNt de eucariota, un ARNt citoplásmico, un ARNt mitocondrial, un ARNt nativo, un ARNt no nativo, un ARNt que está cargado, un ARNt que no está cargado, un ARNt que no es cargable, un ARNt cargado con un aminoácido natural, un ARNt cargado con un aminoácido no natural, un ARNt cargado con un aminoácido estándar, un ARNt cargado con un aminoácido no estándar, un ARNt cargado con el aminoácido correcto, un ARNt cargado con el aminoácido  
45 erróneo, un ARNt cargado que emplea acilación normal para conectar el aminoácido, un ARNt cargado que no emplea acilación normal para conectar el aminoácido, un ARNt cargable con un aminoácido, un ARNt cargable con más de un aminoácido, un ARNt iniciador, un ARNt elongador, un ARNt supresor, un ARNt que sirve de cebador, un ARNt que sirve de cebador para la síntesis enzimática, un ARNt que sirve de una ribozima, un ARNt que sirve de un cebador para una ribozima, un ARNt que sirve de un cebador retroviral, un ARNt hiperactivo, un ARNt hipoactivo, un  
50 ARNt con un anticodón correcto, un ARNt con un anticodón incorrecto, un ARNt con un anticodón de tres nucleótidos, un ARNt con un anticodón de tres nucleótidos distintos, un ARNt que funciona normalmente en un ribosoma, un ARNt que no funciona normalmente en un ribosoma, un ARNt que se carga correctamente por una aminoacil sintetasa, un ARNt que no está cargado correctamente por una aminoacil sintetasa, un ARNt que se une a un factor de elongación, un ARNt que no se une a un factor de elongación, un ARNt que formará un complejo ternario, un ARNt que no formará un complejo ternario, un ARNt que formará un complejo de iniciación, un ARNt que no formará un complejo de iniciación, una ARNt marcado, un ARNt analítico, un ARNt de diagnóstico, un ARNt  
55 60 65

terapéutico, un ARNt de obtención de imágenes, un ARNt profiláctico, una vacuna de ARNt, una hebra de ARNt, un ARNt radiactivo, un producto radiofarmacéutico de ARNt, un ARNt fluorescentemente marcado, un ARNt enzimáticamente marcado, un ARNt biotinilado, un ARNt magnéticamente marcado, un ARNt unido a un agente de obtención de imágenes, un ARNt modificado para ser un agente de obtención de imágenes, un ARNt purificado, un ARNt no purificado, un ARNt separado, un ARNt sin separar, un ARNt aislado, un ARNt sin aislar, un ARNt *in vivo*, un ARNt *in vitro*, un ARNt *ex vivo*, una preparación de ARNt, una preparación homogénea de ARNt, una preparación heterogénea de ARNt, un ARNt con un sitio de enlace de ARNt ('TLS') natural, un ARNt con un TLS no natural, un ARNt con un conector de ARNt ('TC') natural, un ARNt con un TC no natural, un ARNt sin un TLS, un ARNt sin un TC, un ARNt contemporáneo, un ARNt con una cola CCA, un ARNt sin una cola CCA, un ARNt con parte de una cola CCA, un antecedente de ARNt, un precursor de ARNt, un ARNt inmaduro, un ARNt maduro, un metabolito de ARNt, un ARNt primordial, un ARNt anormal, un ARNt consenso, un ARNt híbrido, un ARNt con una o más mutaciones, un ARNt con una o más modificaciones naturales, un ARNt con una o más modificaciones no naturales, un ARNt con un nucleótido o nucleósido no natural, un ARNt con una base modificada no natural, un ARNt con un esqueleto no natural, un ARNt con un esqueleto modificado, un ARNt con uno o más enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en el esqueleto, un ARNt con un tallo de aminoácido no natural, un ARNt con un tallo de dihidrouridina no natural, un ARNt con un tallo anticodón no natural, un ARNt con un tallo de pseudouridina no natural, un ARNt con un bucle de dihidrouridina no natural, un ARNt con un bucle anticodón no natural, un ARNt con un bucle de pseudouridina no natural, un ARNt con un tallo de aminoácido modificado, un ARNt con un tallo de dihidrouridina modificada, un ARNt con un tallo anticodón modificado, un ARNt con un tallo de pseudouridina modificada, un ARNt con un bucle de dihidrouridina modificada, un ARNt con un bucle anticodón modificado, un ARNt con un bucle de pseudouridina modificada, un ARNt conjugado con otra molécula, un ARNt unido a otra molécula, un ARNt asociado a otra molécula, un ARNt con estructura primaria, un ARNt con estructura secundaria, un ARNt con estructura terciaria, un ARNt en una estructura cuaternaria, un ARNt multimérico, un ARNt dimérico, un ARNt trimérico, un ARNt recubierto, un ARNt activado, un ARNt inactivado, un ARNt bloqueado, un ARNt personalizado, un ARNt especializado, un ARNt formulado, un ARNt formulado con un excipiente, un ARNt estabilizado, un ARNt reticulado, un ARNt secado, un ARNt liofilizado, un ARNt en solución, un cristal de ARNt, un polvo de ARNt, una amalgama de ARNt, una suspensión de ARNt, un coloide de ARNt, un precipitado de ARNt, un aerosol de ARNt, una pomada de ARNt, una mezcla de ARNt, cualquier combinación de dos o más miembros de este grupo, y cualquier híbrido de dos o más miembros de este grupo.

30 Nuclión de ARNt: Como se usa en el presente documento, 'nuclión de ARNt' se refiere a un nuclión con al menos una ribocápside de ARNt.

35 Preparación de nuclión de ARNt: Como se usa en el presente documento, una 'preparación de nuclión de ARNt' es una composición (no un método o proceso) que se refiere a una preparación de nuclión en la que al menos uno de los nucliones es un nuclión de ARNt.

Ribocápside de ARNt: Como se usa en el presente documento, 'ribocápside de ARNt' se refiere a una ribocápside en la que al menos una subunidad de ribocápside es una subunidad de ribocápside de ARNt.

40 Subunidad de ribocápside de ARNt: Como se usa en el presente documento, 'subunidad de ribocápside de ARNt' se refiere a una subunidad de ribocápside que es principalmente ARNt.

45 Preparación de subunidad de ribocápside de ARNt: Como se usa en el presente documento, una 'preparación de subunidad de ribocápside de ARNt' es una composición (no un método o proceso) en la que al menos una de las subunidades de ribocápside es una subunidad de ribocápside de ARNt.

#### ARN de transferencia

50 Moléculas de ARN de transferencia contemporáneo sirven de adaptadores moleculares, para traducir la información de secuencia de nucleótidos en ARN mensajero en un polímero de aminoácidos (a medida que aumenta la longitud de este polímero, se denomina, progresivamente, un péptido, oligopéptido, polipéptido o proteína). Cada ARNt está aminoacilado ('cargado') con un aminoácido específico por una enzima de proteína (una aminoacil ARNt sintetasa). Cada ARNt normalmente contiene un anticodón de tres nucleótidos que se une específicamente al codón de tres nucleótidos correspondiente en ARNm (Labuda et al., 1982, Biochem. Biophys. Acta, 689:230). Una molécula de ARNt normalmente está unida a solo un tipo de aminoácido, pero debido a que el código genético contiene múltiples codones que precisan el mismo aminoácido, las moléculas de ARNt que llevan diferentes anticodones pueden llevar el mismo aminoácido. La especificidad de un ARNt dado se indica en el presente documento incluyendo una referencia al aminoácido asociado, en la forma de 'ARNt<sup>aaa</sup>' o 'ARNt<sup>aaa</sup>' donde 'aaa' es el nombre del aminoácido (por ejemplo, metionina) o el símbolo de tres letras estándar para el aminoácido (por ejemplo, 'Met' o 'met' para metionina). Un ARNt cargado (aminoacilado) se describe en el presente documento usando el formato 'AAA-ARNt', 'AAA-ARNt<sup>aaa</sup>' o 'AAA-ARNt<sup>aaa</sup>', donde 'AAA' es el nombre del aminoácido conectado al ARNt o el símbolo de tres letras estándar para el aminoácido.

65 Dentro del ribosoma contemporáneo, el polipéptido en un ARNt unido a un codón se transfiere al aminoácido en el ARNt unido al siguiente codón ('transferencia de peptidilo'), tras lo cual la cadena de polipéptidos se extiende por un

aminoácido. El ARNt que previamente contenía el polipéptido sale del ribosoma y está disponible para la recarga. En cada organismo, hay dos clases de moléculas de ARN de transferencia, ARNt elongadores y ARNt iniciadores. Los ARNt elongadores, que representan la mayoría de las moléculas de ARNt, son responsables del suministro rutinario de aminoácidos a la cadena de polipéptidos en crecimiento. Los ARNt iniciadores son moléculas de ARNt especializadas, que participan en el reconocimiento de codones de iniciación en el ARNm, y tienen características estructurales personalizadas para cumplir esta función. En bacterias y orgánulos eucariotas relacionados, se añade un grupo formilo a la metionina en la cola CCA del ARNt iniciador. Muchos eucariotas, por otra parte, sustituyen la ribosilimina en la posición 54 en sus ARNt iniciadores citoplásmicos con una adenosina. La clase de un ARNt dado, iniciador o elongador, se indica en el presente documento por la inclusión de la letra 'i' o 'e', respectivamente, en las abreviaturas de ARNt definidas en el párrafo previo.

Aunque se ha especulado sobre la posibilidad de interacciones intermoleculares entre moléculas de ARN de transferencia adyacentes unidas a ARN mensajero (Webb, 1973, A Role for Pseudo-uridine, páginas 1-7, 20-23 y 223-240 en The Purification and Crystallisation of Transfer Ribonucleic Acids from Escherichia coli. Una tesis presentada para el grado de Doctor en Filosofía de La Universidad de Londres por Nigel Lawrence Webb, King's College, Londres, R.U.; Schimmel et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91:11283), ninguna de estas especulaciones predijo que las moléculas de ARNt podrían formar nucliones y ribocápsides como se enseña por varias realizaciones de la presente invención, ni esta especulación predijo correctamente los mecanismos de unión inter-ARNt encontrados en la naturaleza. Se han construido estructuras cuaternarias sintéticas de moléculas de ARNt (Severcan et al., 2010, Nat. Chem., 2:772), pero no se ha mostrado que tales estructuras existan en la naturaleza y no tienen las características físicas y químicas o las ventajas de nucliones o ribocápsides, que incluyen, pero no se limitan a, los medios por los que estas últimas pueden encapsular ácidos nucleicos.

En la biología molecular, la estructura primaria de una macromolécula no reticulada no ramificada típica tal como ADN, ARN o proteína es la especificación de su composición atómica y los enlaces químicos que conectan aquellos átomos. La estructura primaria de una macromolécula biológica es equivalente a especificar la secuencia química de sus monómeros, por ejemplo, los nucleótidos o aminoácidos. La dirección de una macromolécula normalmente se refiere a la orientación química extremo a extremo de una hebra individual. Con ácidos nucleicos, el convenio químico de nombrar los átomos de carbono en el nucleótido numéricamente da lugar a un extremo 5' y un extremo 3'. El extremo 5' designa el extremo de la hebra de ADN o ARN que tiene el quinto carbono en el anillo de azúcar de la desoxirribosa o ribosa, respectivamente, en su extremo. El extremo 3' de una hebra se llama así debido a su terminación en el grupo hidroxilo del tercer carbono en el anillo de azúcar, y se conoce como la 'cola'. Las posiciones relativas de estructuras a lo largo de una hebra de ácido nucleico, tales como genes, codones y diversos sitios de unión, se indican normalmente como que están o bien 'en la dirección 5'' (hacia el extremo 5') o 'en la dirección 3'' (hacia el extremo 3').

La estructura secundaria normalmente se define por los enlaces de hidrógeno intramoleculares: en proteínas, entre grupos amida y carboxilo del esqueleto; en ácidos nucleicos, entre pares de bases nitrogenadas ('pares de bases'). La estructura secundaria de los ARN puede descomponerse frecuentemente (en tallos y bucles) y adicionalmente clasificarse (por ejemplo, en horquillas, tallos apilados, tallo-bucles, tetrabucles y pseudonudos). Muchos de estos elementos estructurales secundarios son funcionalmente importantes para los ARN biológicos, tales como ARN de transferencia.

#### Nucliones y ribocápsides

Los nucliones y ribocápsides descritos en el presente documento pueden caracterizarse, fabricarse y ensayarse con uno o más de los siguientes métodos:

Minería de datos. Se identifican patrones conservados en la estructura y composición de las moléculas de ARNt a partir de grandes conjuntos de datos de secuencias de ARNt y bases de ARNt modificado.

Modelado informático. Se realiza modelado informático para definir las interacciones entre moléculas de ARNt adyacentes unidas a ARNm y las estructuras que resultan.

Fabricación de nucliones. Se fabrican nucliones y ribocápsides y se ensayan con una variedad de condiciones usando múltiples tipos de ARNt, ARNm y moléculas de ARN sintéticas.

#### Minería de datos

La Figura 3A presenta los resultados del estudio de minería de datos de los presentes inventores de la prevalencia de nucleósidos en 623 secuencias de ARN de transferencia informadas en la base de datos pública denominada en el presente documento 'tRNAdb' (Jühling et al., 2009, Nucleic Acids Res., 37:D159), que incluye ARNt iniciadores y elongadores naturales en todos los dominios biológicos, clases, especificidades y compartimentos celulares (véase 'Materiales y métodos para minería de datos y modelado informático'). La numeración de la localización de los nucleósidos de ARNt en la Figura 3A sigue el convenio adoptado por Jühling et al. (este convenio de numeración se emplea para ARNt en todo el presente documento). En la estructura secundaria de ARNt consenso mostrada en la

Figura 3A, líneas de puntos indican apareamiento de bases canónicas y flechas indican apilamiento de (i) el tallo de aminoácido (1-7; 66-72) con el tallo de pseudouridina (49-53; 61-65), y (ii) el tallo anticodón (27-31; 39-43) con el tallo de dihidrouridina (10-13; 22-25). 'Nucleósido' en esta figura incluye tanto la molécula de base como cualquier modificación de la misma. Una representación lineal de los nucleótidos en un ARNt particular en una dirección desde el extremo 5' del ARN hasta el extremo 3' constituiría la estructura primaria de la molécula.

Los tallos de aminoácido ('AA'), pseudouridina ('P'), anticodón ('AC') y dihidrouridina ('D') están marcados en la Figura 3A y en cualquier parte se denominan tallo-AA, tallo-P, tallo-AC y tallo-D, respectivamente. En todo el presente documento, 'aa' y "AA" se usan como abreviaturas para aminoácido. Otros elementos estructurales de ARNt marcados en la Figura 3A incluyen el sitio de unión del aminoácido ('aa' dentro de un círculo próximo a 76), el bucle de pseudouridina (54-60, bucle-P), el bucle anticodón (32-38, bucle-AC) que contiene el anticodón (34-36 dentro del recuadro verde), el bucle de dihidrouridina (14-21, bucle-D) y el bucle variable (44-47, bucle-V). Las setenta y seis localizaciones marcadas 1-76 están normalmente ocupadas por un nucleótido y están marcadas O (de ocupado), a menos que se marquen de otro modo para prevalencia (véase más adelante). A diferencia, veintitrés localizaciones (0, 17a, 20a, 20b, e1-5, e11-17 y e21-27) no están normalmente ocupadas y están marcadas E (de extra).

Los recuadros amarillos en la Figura 3A indican localizaciones donde un grupo de nucleósido (G, A, C o U), junto con cualquier modificación del mismo, tiene una prevalencia de secuencias (SP) del 90 % o más dentro de las 623 secuencias analizadas. Las letras en tipo normal o cursivo dentro de tales recuadros amarillos indican, respectivamente, (i) el grupo de nucleósido con una SP de más del 90 % en esa localización (G, A, C o U) o (ii) el nucleósido modificado con una SP de más del 50 % en esa localización (P o T). Los recuadros azules indican localizaciones donde la clase de nucleósidos (purina o pirimidina) tiene una SP del 90 % o más. Las letras en tipo normal o cursivo dentro de tales recuadros azules indican, respectivamente, (i) la clase de nucleósidos con una SP de más del 90 % en esa localización (R para purina, Y para pirimidina) o (ii) el nucleósido modificado con una SP de más del 50 % en esa localización (H para adenosina modificada). La D en la posición 20 indica dihidrouridina con una SP de más del 50 % en esa localización. La Figura 3B es una tabla de los símbolos de prevalencia de secuencias y abreviaturas de nucleósidos usados en la Figura 3A. Ciertos nucleósidos están marcados con un asterisco para indicar que los datos relacionados se refieren a tanto las formas básicas como modificadas de tal nucleósido.

Normalmente hay 7, 5, 5 y 4 pares de bases en los tallos-AA, P, AC y D, respectivamente, para un total de 21 pares de bases en cuatro hélices de ARN bicatenario. Este alto nivel de conservación de nucleósidos, clase de nucleósido y estructuras helicoidales se observa sustancialmente a través de todos los dominios biológicos, clases de ARNt, especificidades de aminoácido y compartimentos celulares representados por estas 623 secuencias.

#### Modelado informático

La estructura terciaria de una macromolécula es la estructura tridimensional de una cadena individual, preferentemente definida por las coordenadas atómicas. La Figura 4A muestra los resultados del estudio de modelado informático de los presentes inventores en el que diez estructuras terciarias de ARNt informadas, determinadas por difracción de rayos X a partir de cristales de ARNt, se superpusieron y se vieron desde el lado derecho de las moléculas (en todo el presente documento, 'derecho' es cuando el ARNt se visualiza desde su cola 3', con el tallo-AC debajo). La Figura 4B es una vista desde el lado distal a la cola 3' de la misma estructura que aquella presentada en la Figura 4A. La Figura 4C proporciona la clave de colores y otra información para las estructuras presentadas en la Figura 4A y la Figura 4B.

Se corroboró el sorprendente grado de conservación de la estructura de ARNt a través de todos los dominios biológicos, implicados por el análisis previo de las estructuras secundarias de ARNt, en esta comparación de estructuras terciarias de ARNt. En todas las estructuras cristalinas de ARNt determinadas hasta la fecha, las hélices del tallo de aminoácido y del tallo de pseudouridina se apilan juntas, mientras que las hélices del tallo anticodón y de dihidrouridina se apilan juntas. El codo de esta estructura de ARNt con forma de L conservada está formado principalmente por interacciones intramoleculares entre los bucles de pseudouridina y de dihidrouridina.

La estructura cuaternaria es la organización definida de dos o más macromoléculas con estructura terciaria. La gran mayoría de las estructuras cuaternarias naturales informadas hasta la fecha son moléculas de proteínas (ejemplos: hemoglobina, filamentos de músculo), o combinaciones de moléculas de proteínas con ácidos nucleicos (ejemplos: ribosomas, virus). Todas estas estructuras cuaternarias se mantienen juntas por una combinación de enlace de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y electrostáticas. El término 'orden cuaternario' se ha aplicado a ADN para su organización de nivel superior en cromatina, donde el ADN está complejado con histonas. También se han descrito interacciones entre unidades de ARN separadas en el ribosoma y el espliceosoma como estructuras cuaternarias de ácido nucleico, pero la mayoría, si no todos, de estos complejos contienen proteínas. Aparte de las hélices dobles de ácidos nucleicos, hasta la fecha se ha informado de algunas estructuras cuaternarias naturales comprendidas únicamente de ácidos nucleicos. Ciertos aptámeros son estructuras cuaternarias de múltiples moléculas de ARN, pero estos ARN no tienen una cáscara de ribocápside con las subunidades oligoméricas o poliméricas que son características de nuclones.

El modelado informático (estudio *in silico*) está siendo usado para predecir y determinar las estructuras secundarias y terciarias de moléculas de ARNt (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. 2011/0112817), pero no hay informes o reivindicaciones de estudios de modelado informático que produjeran las estructuras de nuclión o ribocápside descritas en el presente documento.

5

Sitios de unión de inter-ARNt

La Figura 5A es un topograma de prevalencia de nucleósidos en el que los 15 nucleósidos de ARNt con un prevalencia de secuencias global del 90 % o más ('GSP90') se presentan en la estructura terciaria de ARNt<sup>Phe</sup> de levadura (Shi et al., 2000, ARN, 6:1091). La Figura 5B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 5A. Este topograma informa de la prevalencia de nucleósidos individuales, no simplemente el tipo de nucleósido (purina o pirimidina). Estos 15 nucleósidos GSP90 en ARNt están localizados en cuatro zonas de conservación, dos de las cuales tienen funciones bien documentadas, el bucle anticodón y la cola CCA de 3' unida al tallo de aminoácido. La cola CCA altamente conservada, que está esterificada ('aminoacilada') con un aminoácido específico para el ARNt preparatorio para la síntesis de proteínas, también sirve de conector de ARNt (TC) en una ribocápside y normalmente se une al sitio de enlace de ARNt en un ARNt de ribocápside adyacente a 5' unido al mismo ARNm.

10

15

20

La mayoría de los nucleósidos GSP90, 11 de los 15, están en la región de codo de ARNt. Tres de estos once nucleósidos GSP90 (A14 y A21 del bucle-D más U8 entre el tallo-AA y tallo-D) forman una estructura triple plana en la base del codo (el 'AUA triple'), que probablemente permite que la molécula de ARNt ajuste su estructura en ciertas circunstancias.

25

30

Ocho de los once nucleósidos de codo están localizados juntos dentro de una pila de cinco capas sustancial (mostrada en la Figura 6A) construida a partir de nueve nucleótidos: seis nucleósidos GSP90 del bucle-P (G53-T54-P55-C56, A58, C93), dos nucleósidos GSP90 del bucle-D (G18-G19) y una purina PSP90 (R57), también del bucle-P. La Figura 6B muestra que los nucleósidos de TLS en la Figura 6A están apareados en bases con otros nucleósidos de TLS y por qué método ('Watson-Crick' indica un par de bases canónicas, 'otro' indica un par de bases de Hoogsteen o de otro tipo). La Figura 6C proporciona la clave de colores para los nucleótidos de TLS en la Figura 6A, usando las abreviaturas definidas en la Figura 3A.

35

Esta pila de nueve nucleótidos en el codo de ARNt es el centro activo del sitio de enlace de ARNt, que normalmente se une a la cola CCA del ARNt de ribocápside adyacente a 3'. No solo están los tipos de nucleósido en este sitio de enlace de ARNt altamente conservado a través de todos los dominios biológicos, sino que sus conformaciones también están altamente conservadas. Durante más de cuarenta años había sido el entendimiento de aquellos expertos en la materia que la función primaria de la secuencia de nucleótidos de ARNt G53-T54-P55-C56 era unirse al ribosoma (Phillips, 1969, Nature, 223:347), así que el descubrimiento de enlaces inter-ARNt fue inesperado.

40

45

La Figura 7A es una vista en primer plano de estos nucleótidos de TLS en las diez estructuras de ARNt informadas previamente comparadas en la Figura 4A. La Figura 7B proporciona la clave de colores y otra información para las estructuras presentadas en la Figura 7A. Con una excepción, las localizaciones de los átomos en estos nucleótidos de TLS en estas estructuras están sustancialmente fijadas en el espacio. Esta observación es sorprendente cuando se considera que las nueve estructuras de conformación incluyen ARNt iniciador de metionina bacteriano de *E. coli* y ARNt elongadores de eucariota de tres especies (ARNt de fenilalanina y ácido aspártico de levadura, de lisina de ternero y de selenocisteína humana). Normalizando las estructuras de los sitios de unión TLS y TC en todos los ARNt elongadores, y usando moléculas de ARNt con geometría conservada (en tanto que la geometría afecte la formación de nucliones), un organismo es capaz de ensamblar ribocápsides uniformes, mientras que permite que los ARNt componentes y sus anticodones asociados varíen según la especificidad de aminoácidos requerida programada por los codones en el ARN mensajero.

50

55

La excepción estructural sustancial en la Figura 7A es el ARNt iniciador de levadura. La levadura, como es típico de muchos eucariotas, sustituye T54 en sus ARNt iniciadores citoplásmicos con una adenosina (Kolitz et al., 2010, FEBS Lett., 21:584), de ahí la varianza espacial observada. Esta adenosina atípica desempeña una función crítica en la modulación de la estructura de nucliones y el marcado asociado de codones de iniciación en ARNm en eucariotas, como se describe más adelante. ARNt iniciadores pueden apagar sitios de unión TLS y TC seleccionados y así interrumpir exactamente los segmentos de ribocápside, proporcionando un poderoso mecanismo para marcar codones de iniciación con distintas estructuras de marca de nuclión.

60

65

Antes del descubrimiento de los nucliones y ribocápsides, ha habido varios estudios experimentales informados de unión y formación de complejos entre ácidos nucleicos, ARNt y otras moléculas, y actividad de patente asociada (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 7.902.169; 7.745.594; 7.049.431; 5.821.052; y las publicaciones de patente de EE.UU. 2010/0056768; 2010/0016409; 2008/0026389; 2005/0266416; 2004/0157304), que incluyen, pero no se limitan a, informes de la unión de anticodones de ARNt a codones complementarios en ARNm y codones complementarios en otros ARNt, pero ninguno de los estudios informados o reivindicaciones de patente ha tratado la unión inter-ARNt entre los sitios TLS y TC en moléculas de ARNt que conduce a la formación de ribocápside polimérica.

## Nuclión con forma de T

La Figura 8A muestra un modelo informático (véase 'Materiales y métodos para minería de datos y modelado informático') de dos moléculas de ARNt unidas a codones de ARNm adyacentes en la estructura de repetición típica de una conformación de nuclión de ARNt (designada la 'forma de T'). La Figura 8B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 8A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B.

La CCA aminoacilada en TC en el ARNt en la dirección 3' de ARNm (aguas abajo) (azul) se une al TLS en el ARNt adyacente a 5' (aguas arriba) (verde oscuro). Los lados izquierdo y derecho del TLS están marcados por las secuencias T54-P55-C56 (amarillo) y G18-G19 (cian), respectivamente. El ARNm (naranja) está próximo al eje del nuclión que se representa por una línea discontinua. En este modelo informático y modelos informáticos posteriores de nucliones, se empleó la estructura cristalina de ARNt<sup>Phe</sup> de levadura (la conformación del bucle anticodón asociado en tal estructura se designa 'forma de L'). Se añadieron moléculas de fenilalanina (rojo) usando la función build con el programa informático PyMOL empleado para el modelado (PyMOL por Surhone et al., VDM Publishing House, 2010) a la cola CCA (frambuesa) para facilitar la visualización y el análisis de la construcción de aminoacilo. Sin embargo, se retuvo la configuración de cola informada de los estudios estructurales de rayos X. En la práctica, se sabe que esta cola CCA es muy flexible. Como resultado, la probable configuración de CCA *in vivo* es más próxima al sitio TLS que se muestra en este modelo informático y modelos informáticos posteriores.

Los ARNt en la ribocápside con forma de T se repiten en una hélice a mano derecha alrededor del eje indicado, con cada cola CCA (de color frambuesa) hacia la dirección de ARNm 5' y cada anticodón (de color verde claro) hacia la dirección de ARNm 3' (todas las referencias a 5' y 3' de aquí en adelante se refieren a la orientación de ARNm). A76 de cada ARNt se alinea con el lado derecho del TLS en el ARNt adyacente en la dirección 5' ('derecho' cuando se ve desde el tallo-AA en el ARNt, con el anticodón abajo). La rotación de la hélice de ARNt por ARNt ( $\sim 98 \pm 10^\circ$ ) es sustancialmente la de tres nucleótidos en el ARN con forma de A canónico ( $98^\circ$ ) pero el aumento de hélice con forma de T por ARNt es diferente ( $\sim 15 \pm 3 \text{ \AA}$  frente a  $\sim 8,4 \text{ \AA}$  para tres nucleótidos en A-ARN). En todo el presente documento, el símbolo '~' significa aproximadamente.

La Figura 9A muestra un modelo informático de tres ARNt tales cuando se ven en el eje del nuclión desde la dirección 5'. La Figura 9B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 9A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B. Los restos de dihidouridina en cada ARNt son adyacentes al tallo de aminoacilo en el ARNt adyacente a 3', de acuerdo con una función para la DHA como aislantes electrostáticos intermoleculares entre sitios TC y TLS, supuestamente para potenciar la especificidad del enlace TC-TLS.

La Figura 10A muestra un modelo informático de diez ARNt con forma de L tales en un nuclión con forma de T. No se observó interferencia estérica a este nivel de compresión axial, de manera que, en principio, sustancialmente no hay límite geométrico a su longitud (en consecuencia, se considera que las subunidades de ARNt en una ribocápside con forma de T son 'poliméricas'), aunque su estabilidad termodinámica puede limitar su longitud en la práctica, en ciertas condiciones medioambientales. La Figura 10B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 10A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B.

El ajuste general entre ARNt adyacentes en este nuclión con forma de T es bueno, pero queda algo de espacio entre ARNt en la dirección axial. Aunque los ARNt con forma de L en esta ribocápside están dispuestos en una estructura helicoidal, los codones y anticodones para cada ARNt en el nuclión con forma de T no están apilados con aquellos de ARNt adyacentes, como se muestra en la Figura 11.

Con la conformación en L del bucle-AC encontrada en cristales de ARNt<sup>Phe</sup> de levadura, la posible interferencia estérica entre tallos-AC adyacentes previene un mayor llenado axial de los ARNt en este nuclión con forma de T. Los codones están próximos al eje del nuclión, con los anticodones fuera de eje. Los anticodones solo están apilados dentro de sus ARNt principales, no entre sí. Los codones en este nuclión con forma de T no están apilados entre sí.

## Nuclión con forma de S

La evidencia de una segunda conformación de bucle anticodón de ARNt ('forma de K') procede de estudios de RMN con ARNt<sup>Phe</sup> de *E. coli* en solución (Cabello-Villegas et al., 2005, Nucleic Acids Res., 33:6961), que sugieren que los nucleótidos 32-33 y 37-38 pueden apilarse opuestos entre así bajo el tallo anticodón. El modelo informático de los presentes inventores de esta segunda conformación de bucle-AC (Figura 12A) muestra los tres nucleótidos anticodón 34-36 sin apilar del tallo de ARNt, a diferencia con el apilamiento anticodón bajo el lado 3' del tallo-AC como se ve en la estructura de bucle-AC en la forma de L (Figura 12B) generalmente informada a partir de las determinaciones de rayos X de estructuras cristalinas de ARNt. Estudios del efecto de la concentración de magnesio sobre la estructura de ARNt también indican más de una confirmación de bucle anticodón (Bujalowski et al., 1986, Biochem., 25:6365) y sugieren que la totalidad de la estructura terciaria de ARNt es dependiente del magnesio (Friederich et al., 1997, Biochem., 36:6090). La cinética de salto de temperatura usando una base modificada fluorescentemente marcada en el ARNt muestra que el bucle anticodón es flexible y cambia la conformación con la unión del codón (Yoon et al., 1975, J. Molec. Biol., 99: 507). Estudios electroforéticos también sugieren múltiples

conformaciones del bucle anticodón (Pieczenik, 1980, J. Molec. Biol. 138:897). En consecuencia, dependiendo de su entorno físico y químico, el bucle-AC puede adoptar más de una conformación, e híbridos de tales conformaciones, entre otros para facilitar la participación de ARNt en ribocápsides y nucliones.

5 La adopción de la forma de K del bucle-AC en un nuclión permite que tanto codones como anticodones se apilen con aquellos de sus vecinos de ARNt (Figura 11), formando una estructura de núcleo helicoidal con dimensiones sustancialmente similares a aquellas de una hélice de ARN con forma de A canónica. El estado de energía más bajo del nuclión comprimido resultante (designado 'forma de S') es termodinámicamente preferible al de la forma de T menos apilado, conduciendo a una transición automática de la ribocápside de forma de T a la forma de S simultánea con la transición del bucle anticodón de la forma de L a la de K. En el nuclión con forma de T, el anticodón con forma de L está apilado bajo el tallo-AC (pero no con anticodones adyacentes), la uridina 33 conservada está dada la vuelta y la purina 37 modificada está parcialmente apilada, mientras que ninguno de los codones está apilado con su vecino. En el nuclión con forma de S, cada anticodón con forma de K se apila principalmente con anticodones adyacentes en lugar de su ARNt principal, pero U33 y R37 se apilan ahora con su ARNt principal, y codones adyacentes también están apilados. Este nuclión con forma de S genera más bases apiladas totales por ARNt que el nuclión con forma de T y más bases en hélices dobles. Una vez se unen los ARNt a ARNm y sus conexiones de TLS los alinean en un nuclión con forma de T, esta diferencia termodinámica puede, siempre que no haya limitaciones geométricas en la dirección 5', conducir automáticamente a la transición de nucliones de la forma T a S.

20 La Figura 13A muestra un modelo informático de cuatro ARNt aminoacilados con forma de K en un nuclión con forma de S en el que todos los codones y anticodones se apilan con aquellos de sus vecinos de ARNt. La Figura 13B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 13A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B. El giro de hélice resultante por ARNt es  $\sim 98^\circ$  (sustancialmente el mismo que A-ARN y el nuclión con forma de T), pero el aumento de hélice por ARNt es ahora  $\sim 8,4 \text{ \AA}$  (frente a  $\sim 15 \pm 3 \text{ \AA}$  para la forma de T), el mismo que para los tres nucleótidos en una hélice de A-ARN. El impacto estructural primario de la transición de la forma de T a la forma de S es una compresión axial de  $\sim 45 \%$  del nuclión, que conduce a empaquetamiento más estrecho de ARNt alrededor del ARNm. En el nuclión con forma de S, el ángulo de aproximación de A76 aminoacilado al TLS es sustancialmente similar al de la forma de T. No fueron evidentes impedimentos estereoquímicos a la transición de T a S propuesta a partir de estudios del modelado informático. Debido a la interferencia estérica, y a diferencia de la forma de T, el número de ARNt adyacentes que participa en un nuclión con forma de S está sustancialmente limitado a cuatro (en consecuencia, las subunidades de ARNt en una ribocápside con forma de S se considera que son 'oligoméricas'). El contacto entre la mayoría del ARNt de 5' en la forma de S (ARNt1) y el ARNt alejado cuatro codones (ARNt5) previene sustancialmente que el último se una al nuclión con forma de S y lo mantenga en la forma de T o una estructura híbrida S/T.

35 Tapa de nuclión con forma de R

El modelado informático mostró que un nuclión con forma de S puede estar terminado en su extremo 5' con una única molécula de ARNt. La Figura 14A muestra un modelo informático de una tapa de ARNt de nuclión con forma de R tal que tiene incluso estado de energía más bajo que los ARNt en las formas de S o T de nuclión, debido a que su bucle anticodón con forma de L se apila con tanto su tallo-AC principal como la hélice de nuclión de núcleo. La Figura 14B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 14A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B.

45 A diferencia, los bucles-AC de ARNt en nucliones con forma de S y T se apilan con o bien el tallo-AC principal o la hélice de nuclión, pero no ambos al mismo tiempo. Estudios de modelado informático mostraron que una tapa de ARNt tal con apilamiento de AC completo puede producirse para solo una molécula de ARNt cada vez y que sus conexiones TC-TLS tienen que ser primero cortadas. El empuje termodinámico para tal apilamiento y ruptura se amplifica por alineamiento coaxial del tallo-AC de la tapa de ARNt con la hélice de núcleo de nuclión, triplicando eficazmente la longitud de la hélice de ARN con forma de S apilada mediante la adición de 10 o más pares de bases en el ARNt de tapa por encima de su bucle-AC.

El tallo de aminoacilo del ARNt de tapa en el nuclión con forma de R puede unirse a una estructura en la dirección 5' en el ARN, con el fin de, entre otras cosas, registrar y sincronizar la unión de una molécula de ARNt iniciador, simultáneo con el preciso registro del marco y la formación mejorada de un complejo de nuclión para marcar el sitio de iniciación en un ARNm. Un ejemplo de una interacción tal en bacterias es la unión del tallo de aminoacilo del ARNt iniciador a una secuencia de marcador de síntesis de proteínas, tal como la secuencia de Shine-Dalgarno ('SD') que está frecuentemente localizada a una corta distancia en la dirección 5' del codón de iniciación en ARNm bacteriano. La secuencia de Shine-Dalgarno también funciona uniéndose a un ribosoma, tras lo cual el ARNt iniciador se desplaza supuestamente desde la unión hasta el sitio SD.

Dinámica del nuclión

65 En células contemporáneas, las propiedades termodinámicas de las diferentes formas de nuclión de ARNt pueden, en condiciones predefinidas, conducir automáticamente a la transición de ARNt aminoacilados de solución libre a (i) unión de ARNm inicial en una estructura de ribocápside con forma de T relativamente sin comprimir de longitud



variable; luego a (ii) una ribocápside con forma de S completamente comprimida de hasta cuatro ARNt de largo; y finalmente a (iii) un ARNt con forma de R coaxial individual que termina la estructura de nuclión. La mayor parte de la porción estable de la estructura de nuclión comprende las formas de R y S, para un total de cinco ARNt (o seis ARNt, cuando se incluye el ARNt híbrido S/T). Un diagrama esquemático de un nuclión de ARNt de compuesto resultante se proporciona en la Figura 15 y un modelo informático de este nuclión se muestra en la Figura 16.

La Figura 17 resume las características físicas de tres formas diferentes de nuclión de ARNt, y presenta el apilamiento, apareamiento de bases y propiedades de dipolo axial que confieren progresivamente estados de energía más baja en las formas de T, S y R. Las relaciones energéticas entre estas tres formas de nuclión explican por qué el ARN mensajero normalmente es traducido en la dirección 5' a 3'. La estructura de una molécula de ARNt necesita que primero entre en el nuclión con forma de T desde la dirección 3', luego se convierte progresivamente de la forma de S a la forma de R en la dirección 5'. Cada vez que se elimina un ARNt con forma de R para la síntesis de proteínas, el ARNt con forma de S adyacente a 3' se convierte en la forma de R y el nuclión se mueve a lo largo del ARNm en la dirección 5' a 3' por un codón.

En este modelo de dinámica de nuclión de ARNt en organismos celulares, los ARNt son progresivamente transportados del nuclión al ribosoma por proteínas de factor de elongación, tras lo cual el segmento de nuclión que contiene los cinco ARNt actuales en la forma de R y S se mueve a lo largo del ARNm en la dirección 5' a 3' con una cola con forma de T, cuya longitud depende en parte del suministro de ARNt aminoacilados. Los ARNt cargados que llegan se unen aleatoriamente a tripletes (no necesariamente codones) en el ARNm, con un tiempo de residencia corto, pero entonces son rápidamente limitados por la ribocápside. En cualquier momento dado, solo un ARNt cargado, unido apropiadamente al codón inmediatamente adyacente al extremo 3' de la T-ribocápside, puede bloquearse en el TLS disponible y abierto en el ARNt adyacente a 5', adoptar el estado de energía más baja con forma de T, y permanecer. Este proceso de selección limita eficientemente los ARNt cargados y preserva la integridad del marco mientras que amplifica el rechazo de ARNt no relacionados. Haciendo esto, el nuclión también actúa de acelerador de carga uniendo ARNt aminoacilados de solución libre pronto, en sustancialmente las cantidades necesarias para la inminente traducción (es decir, precarga de almacenamiento), avanzando así bucles de retroalimentación que modulan su síntesis. El modelo proporciona que, dependiendo del estado de terminación y otros factores, el número de ARNt contemporáneos unidos contiguamente a un sitio de ARNm es cuatro o cinco, correspondiente al agregado de las formas de nuclión R y S. La estabilidad relativa de esta estructura con forma de T bajo condiciones predefinidas puede ser sustancialmente inferior a la de la forma de S. El ARNt híbrido S/T inmediatamente adyacente a un ARNt con forma de S puede apilarse con el último, dando un total de seis ARNt contiguos en un nuclión comprimido.

Como se describe en el presente documento, en ciertas condiciones un ARNt debe ser aminoacilado con el fin de convertirse de una estructura con forma de T en una estructura con forma de S, y este requisito proporciona un método de cribado adicional para asegurar la integridad de ARNt cargados. Mientras que los ARNt en la forma de S deben cargarse, el nuclión con forma de T puede acomodar tanto ARNt cargados como no cargados. También es posible que la aminoacilación de un ARNt cambie sus propiedades eléctricas y facilite la conversión de su anticodón en la conformación preferida para una estructura de nuclión con forma de S.

El nuclión de ARNt moderno almacena de forma segura ARNt aminoacilados, que de otro modo tendrían una semivida relativamente corta en solución libre (Pütz et al., 1997, *Nucleic Acids Res.*, 125:1862) y desperdiciarían valiosa energía libre. En otras palabras, el nuclión de ARNt funciona como una batería. El sistema de gestión de inventarios FIFO (primero en entrar, primero en salir) también actúa de acelerador de la traducción precargando el ARNm, de manera que el centro de transferencia de peptidilo ribosómico no tiene que esperar tanto para el acceso browniano secuencial por los ARNt cargados necesarios; las cinéticas de entrada están favorablemente saturadas. Una tapa de nuclión marca tramos de codones limitados y facilita el control por otras moléculas. La traducción se empieza por el bloqueo de ARNt iniciador de enlaces TC-TLS, provocando así la terminación por el iniciador o su vecino. La ribocápside de ARNt puede también proteger el ARN mensajero de la hidrólisis, ataque enzimático o corrupción, y sirve de vehículo para transportar el mensajero dentro de la célula y entre diferentes compartimentos en células eucariotas. Estas percepciones forman la base de varios aspectos de la presente descripción.

#### Nucliones de iniciación

La función de núcleo de enlaces TC-TLS entre ARNt de ribocápside adyacentes proporcionó un mecanismo natural para que un nuclión de ARNt marcara un codón de iniciación en ARN mensajero. Un nuclión tal se denomina en el presente documento un 'nuclión de iniciación'. Los ARNt iniciadores han evolucionado para bloquear uno de los dos enlaces TC-TLS con sus vecinos 5' y 3' en el ARNm, forzando a entrar un ARNt en la posición de tapa en el nuclión y proporcionando una marca de ribocápside para que el ribosoma inicie la síntesis de proteínas. Como se muestra en los dibujos esquemáticos de la Figura 18 y Figura 19, dos direcciones de bloqueo del enlace fueron posibles en la evolución: en la dirección 5' o en la dirección 3' del ARNt iniciador, es decir, hacia su vecino 5' o 3', respectivamente. Una o ambas de estas direcciones de bloqueo se emplean en varios aspectos de la presente descripción.

Un bloqueo en la dirección 5' (mostrado en la Figura 18), que es utilizado por bacterias y orgánulos eucariotas relacionados, requiere la modificación de la cola de aminoácido de TC en el ARNt iniciador, para prevenir la conexión

con el ARNt en la dirección 5', forzando así entrar al ARNt iniciador en la posición de tapa con forma de R. El nuclión de iniciación bacteriano resultante marca el codón de iniciación para la síntesis de proteínas. Con este tipo de ARNt iniciador en bacterias, un grupo formilo está unido a la metionina en la cola CCA, con el fin de prevenir este sitio de unión TC al TLS en el ARNt adyacente en la dirección 5'. Un beneficio adicional de tal formilación es que estabiliza el enlace aminoacilo en el ARNt iniciador. Este enlace se expone y no está protegido por la unión de ribocápside normal debido a que el ARNt iniciador es la subunidad de ribocápside más hacia 5'.

A diferencia, el bloqueo en la dirección 3' (como se muestra en la Figura 19) utilizado por ARNt iniciadores citoplásmicos en eucariotas, emplea una modificación al sitio TLS iniciador, con el fin de prevenir la unión de CT en el ARNt adyacente a 3', forzando así a entrar este vecino en la dirección 3' en la posición de tapa y generando un nuclión de iniciación eucariota.

Estos mecanismos de iniciación de nucliones generan diferentes resultados de terminación para los dos tipos de bloqueo del enlace. Con un bloqueo en la dirección 5', la tapa en el nuclión de iniciación es el propio ARNt iniciador, que ocupa el codón de iniciación en el ARNm. Con un bloqueo en la dirección 3', sin embargo, la tapa en el nuclión de iniciación no es el ARNt iniciador sino su vecino en 3', y el codón de iniciación está desocupado. Esta distinción entre nucliones iniciadores está de acuerdo con las diferencias observadas en la iniciación ribosómica entre bacterias y eucariota. Mientras que los ribosomas bacterianos inician directamente en el codón de iniciación ocupado, el ribosoma eucariota forma primero un complejo que incluye un ARNt iniciador, remoto del codón de iniciación, luego el complejo ribosómico barre el ARNm buscando un codón de iniciación abierto. El marcado eucariota del sitio de iniciación con una tapa de nuclión de R-ARNt en el segundo codón que va a traducirse proporciona una diana notoria para el barrido de ribosoma y reduce la necesidad de reconocimiento de codones en la dirección 5' o registro del marco preliminar. Esta diferencia en los mecanismos de iniciación de nucliones también está de acuerdo con el hecho de que los ARN mensajeros en bacterias y orgánulos eucariotas relacionados son generalmente policistrónicos (es decir, tienen múltiples marcos de lectura abiertos, o 'ORF'), mientras que la mayoría de los ARNm en el citoplasma de eucariotas (incluyendo animales y seres humanos) son monocistrónicos (con un ORF). En bacterias, los ribosomas pueden unirse al ARNm en múltiples codones de iniciación marcados por múltiples estructuras de nuclión, mientras que los ribosomas en eucariotas normalmente se unen solo al extremo 5' del ARNm. Los estudios de modelado informático de los presentes inventores indican que ciertos virus en eucariota han aprendido cómo evitar estos sistemas de control de marca de nuclión simulando señales de inicio del nuclión en el centro del ARNm y atrayendo a los ribosomas directamente a estos sitios internos de entrada al ribosoma ('IRES').

En todos los dominios biológicos, el nuclión de la estructura de ARNt de cinco ARNt limitados en la dirección 3' en codones codificantes (una forma de R más cuatro formas de S) proporciona un excelente registro del marco de codones con la exactitud de al menos quince pares de bases de ARN consecutivas, apiladas y canónicas. Este almacenamiento de ARNt cargados pre-limitados también es importante para la eficiente operación de ribosomas, formando un inventario organizado de ARNt aminoacilados y acelerando su síntesis. Los eucariotas pueden haber evolucionado bien a una estrategia de bloqueo de enlaces de ARNt iniciador diferente a partir de bacterias como una ventaja selectiva con la que impedir la infección. Sin embargo, los rigurosos requisitos estereoquímicos para la formación de nucliones, conducidos por la física y química de la hélice de ARN del nuclión, supusieron que tenía que ser retenida la geometría de ARNt fundamental.

#### Síntesis de proteínas por nucliones

Los estudios de los presentes inventores de los nucleósidos en el sitio de enlace de ARNt indican que los ancestros de los nucliones modernos condujeron la síntesis de proteínas antes de la llegada de los ribosomas, con un TLS primordial que contiene nucleósidos de pseudouridina en ambas posiciones 54 y 55 (este sitio de enlace de ARNt primordial se llama un 'PLS'). La pseudouridina es el único nucleósido modificado que puede ser sintetizado de forma demostrable por ARN sin proteínas (se isomeriza a partir de uridina), proporcionando una lógica de apoyo para la función temprana y crítica de la pseudouridina en la transferencia de peptidilo. Esta percepción en la evolución temprana es relevante para la medicina de hoy en día, por ejemplo, debido a que cambios en los ARNt modernos que revierten el TLS a su configuración de PLS ancestral pueden desencadenar la transferencia de peptidilo fuera del ribosoma. Tal síntesis de proteínas no deseada puede conducir a perturbaciones en el control celular y, en ciertas circunstancias, a proliferación celular incontrolada y trastornos asociados tales como cáncer. Un entendimiento del origen de la síntesis de proteínas por nucliones, antes de la disponibilidad de los ribosomas, puede ayudar a un experto en la materia a diseñar, fabricar y usar nucliones y ribocápsides para una variedad de aplicaciones industriales.

La secuencia crítica de eventos, que convirtieron la vida en nuestro planeta de un mundo de ARN exclusivamente (The RNA World por Gesteland et al., Cold Spring Harbor Monograph Series, Tercera Edición, 2005) en nuestra biosfera actual, que se basa en la traducción de ácidos nucleicos en proteínas, probablemente se reveló del siguiente modo (aunque si la siguiente explicación es o no precisa no afecta la naturaleza, alcance o utilidad de la presente invención).

En el mundo del ARN, las moléculas se replicaban aleatoriamente, conduciendo a mezclas complejas de hebras de ARN más y menos, en cierta medida complementarias. Se degradaban rápidamente, de manera que la presión

selectiva condujo a ARN con estructuras secundarias, luego terciarias, para resistir mejor al entorno. Las moléculas se combinaron en intercambios al azar. Entonces, se fusionaron dos estructuras de horquilla en un ARN más grande, un ancestro del ARN de transferencia moderno (Bernhardt et al., 2010, Biology Direct, 5:16), que podía tanto replicarse como rodearse él mismo con una ribocápside. Los nucliones habían entrado en el mundo.

5 Después, una conformación poco usual en un descendiente del ARN causó que U55 se isomerizara a pseudouridina, que potenció la estabilidad de la ribocápside uniendo una adenosina en el ARN adyacente a 3'. No había células en este momento, pero sin embargo ocurrió la especialización. Dentro de la mezcla de moléculas de ARN, las hebras más y menos desarrollaron habilidades diferentes, pero sinérgicas, mientras que seguían siendo complementarias. Continuó la transcripción infinita de hebras más a hebras menos, y viceversa. Con el aumento de la protección ahora proporcionada por las ribocápsides, la hebra de ARN más en el núcleo del nuclión creció progresivamente en longitud. Desarrolló actividad de ribozima que cortó las hebras menos recién formadas en múltiples segmentos de ARN de ribocápside.

15 Cada hebra de ARN más de núcleo larga se unió a varias hebras menos cortas por apareamiento triple, conducido por la estereoquímica de la hélice de ARN y la termodinámica de nucliones, no por cualquier deseo profético para aminoácidos. Las tres conformaciones de nuclión se formaron rutinariamente, comprimiendo T a S, terminando entonces con R. La tapa de R era el estado de energía más baja para una ribocápside ARN, de manera que, en esta etapa de evolución, no se movió una vez formada. Estas estructuras de RS locales otorgaron una ventaja selectiva a los nucliones, ya que aumentaron su estabilidad. El ARN de ribocápside evolucionó gradualmente a diferentes características, aún cuando todas estaban programadas por una hebra de núcleo.

25 El ARN de hebra más aprendió pronto que algunos ARN de hebra menos eran mejores que otros en diferentes sitios en la ribocápside. Emergió un código genético rudimentario en este ARN de núcleo para programar la unión de ribocápside, usando solo una o dos de los tres nucleósidos de unión a ribocápside. La presión de supervivencia darwiniana condujo progresivamente a un código más sofisticado que programó ARN de múltiples ribocápsides, precursores de los ARNt modernos, pero todavía no cargados con aminoácidos. Los nucliones empezaron a presentar más estructura. Por bloqueo programado de la unión de inter-ARN de ribocápside, pudieron ensamblarse segmentos de nuclión distintos, pero asociados, en estructuras de orden superior. Habían empezado a evolucionar los genes primitivos y la mecánica de iniciación. Sin embargo, la función primaria del primer genoma de nuclión era la especificación y el ensamblaje de ARN de ribocápside, no aminoácidos, y mucho menos proteínas.

35 Estos nucliones tempranos protegieron sus genomas de ARN y, después, los transportaron a localizaciones tales como la superficie del océano donde abundantes aminoácidos se unieron aleatoriamente a los extremos 3' del ARN de ribocápside. Sus descendientes aprendieron a cómo decorar útilmente sus ribocápsides con aminoácidos, y, después, atraer aminoácidos específicos a ARN de ribocápside individual. Con el tiempo, una porción del genoma del nuclión pasó lógicamente de programar ARN de ribocápside a programar aminoácidos unidos a aquellos ARN, en reconocimiento de la contribución cada vez mayor de los aminoácidos a la integridad, supervivencia y replicación de nucliones. La mayoría de los ARN de ribocápside, pero no todos, pasaron progresivamente a la función de adaptadores moleculares para aminoácidos. Pero, hasta ahora, no eran todavía proteínas.

45 Entonces, U54 en ARNt ancestral se isomerizó a pseudouridina y el nuclión se transformó en un motor helicoidal. El nuclión empezó a moverse a lo largo del genoma de ARN, mientras que la terminación repetitiva catalizó la transferencia de aminoácidos sucesivos de una subunidad de ribocápside a la siguiente. Inicialmente, la mezcla de aminoácidos en los polipéptidos resultantes reflejó pasivamente aquellos de los aminoácidos de cápside. Estos polipéptidos tempranos tuvieron poca, si alguna, utilidad bioquímica, pero su electroquímica y novedosas estructuras mejoraron la estabilidad de la ribocápside y la termodinámica de nucliones. Todo sin necesitar energía libre incremental, ya que el combustible adicional para conducir este motor helicoidal de ARN había procedido de la aminoacilación en localizaciones tales como la superficie del océano. Había nacido la síntesis de proteínas.

50 Hasta este punto en la evolución molecular, las únicas formas de vida eran nucliones que contenían una única molécula de ARN dentro de una o más ribocápsides. El genoma de ARN contenía todos los datos para preparar ARN de ribocápside, actividad de ribozima para fabricarlos y un programa para ensamblarlos. Los nucliones trabajaron bien durante millones de años, pero fueron por último lugar limitados por el movimiento browniano que tendió a dispersar sus componentes de ARN. Los compartimentos llegaron a ser necesarios. Inicialmente, orificios minúsculos en la piedra pómez podrían haber sido suficientes, o quizás las decoraciones de péptidos mantuvieron el nuclión en superficies de solución en el océano. En cualquier caso, el genoma de ARN necesitaba un nuevo hogar.

60 Las primeras proteínas programadas fueron probablemente simples polímeros de repetición, ricos en aminoácidos como glicina y alanina, para hacer pegamento de hojas beta y reducir la migración browniana. Después, este pegamento útil evolucionó en proteínas estructurales más sofisticadas, los ancestros de la queratina, para limitar mejor el entorno local. Mucho después, evolucionaron las enzimas de proteína, que, inicialmente, solo podían operar en macromoléculas limitadas por el pegamento de proteína. Con el tiempo, evolucionaron las células crudas para reducir la migración de moléculas pequeñas y permitir su conversión bioquímica por las enzimas en evolución.

65

El genoma de ARN en el nuclión estaba ahora creciendo demasiado y era difícil de manejar para preservar con exactitud toda la información que necesitaba para la replicación, traducción y control, mientras que continuaba proporcionando servicios de ribozima. Una vez se había movido a su nuevo hogar celular, esta molécula pionera empezó a subcontratar actividades que podían ser hechas por otros. Se fusionaron dos ARN de ribocápside para formar el primer ribosoma (el análisis de los presentes inventores de la secuencia de ARN en el centro de transferencia de peptidilo de ribosomas contemporáneos indica que este PTC evolucionó a partir de dos bucles-P similares a ARNt, que ahora sirven para alinear las colas CCA de los ARNt en los sitios A y P). Después, todos los programas y datos fueron copiados en una nueva molécula llamada ADN, que fue buena en la reproducción y almacenamiento, pero no mucho más, tras lo cual el genoma de ARN asumió la función de ARN mensajero. Las proteínas y otros ARN continuaron dividiendo el trabajo estructural y catalítico, y colaboraron de vez en cuando. Había empezado a evolucionar la vida como nosotros la conocemos ahora en nuestra biosfera.

La Figura 20A es un modelo informático de la transferencia de peptidilo por tres ARNt interactuantes en el extremo 5' de un nuclión ancestral, contemporáneo anormal, o no natural, donde al menos el ARNt T1 de terminación tiene un sitio de tipo primordial TLS ('PLS') que contiene dos pseudouridinas en las posiciones 54 y 55. La Figura 20B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 20A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B.

Este PLS en la tapa de ARNt1 está próximo al eje del nuclión, de manera que los conectores de CCA en los dos ARNt siguientes (ARNt2 y t-RNA3) pueden unirse al mismo tiempo al PLS en ARNt1, configurando el extremo 5' de este nuclión para la síntesis de proteínas. Según el dibujo esquemático mostrado en la Figura 21, el centro de transferencia de peptidilo ('PTC') resultante operó del siguiente modo (donde 'izquierdo' y 'derecho' se refieren a la vista de PLS desde el tallo de aminoacilo en ARNt1, con su tallo anticodón abajo):

1. ARNt1 tapa el nuclión, posicionando el PLS cerca del eje del nuclión;
2. El péptido CCA en ARNt2 se une al lado izquierdo de PLS;
3. El aminoácido CCA en ARNt3 se une al lado derecho del PLS;
4. El péptido en crecimiento se transfiere de ARNt2 al aminoácido en ARNt3;
5. ARNt2, sin péptido unido, desplaza ARNt1;
6. ARNt1 sale del nuclión; y
7. El ciclo se repite con ARNt2 como tapa (incrementos de la numeración de ARNt de uno).

La Figura 22 es un modelo informático de síntesis de proteínas por el nuclión primordial (o uno contemporáneo anormal), correspondiente al dibujo esquemático de la Figura 21. La energía para conducir el proceso procede de los conductores termodinámicos de la transición de nucleones y la liberación secuencial de enlaces de alta energía que conectan los aminoácidos con sus ARNt. La cadena de polipéptidos resultante es sustancialmente co-axial con el nuclión, y el giro helicoidal para un aminoácido en una hélice alfa de proteína (100°) es (probablemente no casualmente) sustancialmente similar a aquél para cada ARNt con forma de S y T en el nuclión (~98°). En consecuencia, la transferencia de peptidilo conducida por nuclión puede avanzar con tensión torsional mínima, si la hay, en el ARNm o la proteína en crecimiento.

La Figura 23A es un modelo informático del centro de transferencia de peptidilo en un nuclión primordial (o contemporáneo anormal), en el que el lado izquierdo del PLS en el ARNt1 de tapa R se une a la cola CCA de ARNt2 con la cadena de polipéptidos en crecimiento PP, y el lado derecho del PLS en ARNt1 se une a la cola CCA de ARNt3 con el siguiente aminoácido AA. La Figura 23B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 23A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B. Los enlaces negros con extremos redondos entre ciertos nucleósidos indican algunas de las interacciones intermoleculares que contribuyen a la transferencia de peptidilo. Las columnas en la tabla indican qué nucleósidos de los tres ARNt se alinean en las seis capas de sitio activo marcadas L0 a L5.

Los anticodones de los tres ARNt están todavía unidos en la forma canónica a sus codones respectivos y estos tres pares codón-anticodón siguieron completamente apilados los unos sobre los otros dentro del estrecho contacto de la hélice de nuclión de núcleo. Cuando ARNt2 y ARNt3 se unen a ARNt1, sus enlaces TC-TLS con otros ARNt se cortan. Los nueve nucleósidos GSP90 conservados en el PLS de ARNt1 están apilados en cinco capas consecutivas L1 a L5. En este ejemplo con ARNt<sup>Phe</sup> de levadura, la capa 1 contiene un par de bases de Watson-Crick desnudas C56-G19, que pueden apilarse sobre el tallo de aminoácido de ARNt2, la capa 2 en el PLS es purina R57 conservada, que actúa catalíticamente en la transferencia de peptidilo, análogo a la adenosina A2602 conservada en el ribosoma 70S. La capa 3 en el PLS es P55 ubicuo unido por G18 en una estructura de Hoogsteen; la capa 4 es P54 que está unido por A58 también por Hoogsteen. La capa 5, que agrupa los PLS, es G53-C31, otro par de Watson-Crick.

La Figura 24A muestra los seis nucleósidos en niveles 3 y 4 del complejo cuaternario formado por los tres ARNt, cuando se ve desde la dirección del tallo de pseudouridina en ARNt1. Cuando ARNt2 y ARNt3 se unen a ARNt1, sus adenosinas del extremo 3' (A76) se unen a P54 y P55, respectivamente. La elipse marcada 'Reacción' resalta el sitio activo donde el grupo amino en ARNt3 de aminoacilo ataca el grupo carboxilo en ARNt2 de peptidilo.

La Figura 24B muestra una vista más próxima de esta reacción de transferencia de peptidilo entre los dos nucleótidos de adenosina A76 (cuando se ve desde arriba el PTC) que transfiere la cadena de polipéptidos en crecimiento de ARNt2 a ARNt3. La elipse marcada 'Reacción' resalta el sitio activo donde el grupo amino en ARNt3 de aminoacilo ataca el grupo carboxilo en ARNt2 de peptidilo.

5 La Figura 24C proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 24A y Figura 24B usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B. Los enlaces negros con extremos redondos entre ciertos nucleósidos indican interacciones intermoleculares en las capas L3 y L4 que contribuyen a la transferencia de peptidilo.

10 En este complejo de reacción, el par de bases triple P55 (T1:G18 - T1:P55 - T3:A76) y el par de bases triple P54 (T1:A58 - T1:P54 - T2:A76) se apilan en las capas 3 y 4 adyacentes, respectivamente, dentro del firme agarre de una pila de ARN multicatenario de 14 nucleósidos más en seis niveles, amplificado por el dipolo de la hélice del aminoacilo coaxial y los tallos de pseudouridina en ARNt1. La cantidad sustancial de enlace de hidrógeno, apilamiento e interacciones electrostáticas entre estos tres ARNt conduce a la formación del complejo. En esta  
15 estructura cuaternaria, los tres ARNt están exactamente alineados para la transferencia de peptidilo. El grupo amino en el ARNt3 de aminoacilo puede atacar fácilmente el grupo carboxilo en ARNt2 de peptidilo. Equipado con un PLS que contienen P54-P55, una ribozima de ARNt en un nuclión ancestral fue capaz de sintetizar proteínas sin proteínas o ribosomas, con sus hermanos de ARNt como sustratos.

20 En los TLS de la mayoría de los ARNt contemporáneos normales, la pseudouridina en la posición 54 se sustituye por una ribosiltimina, que bloquea la unión de A76 en el ARNt2 requerido para la transferencia de peptidilo (véase la Figura 25A), ya que tal síntesis de proteínas no ribosómica no es deseable en células modernas. La Figura 25B proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 25A usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B.

25 La Figura 25C muestra la estructura de bases triple habilitada por P54 en la configuración de PLS ancestral, que puede desencadenar la unión de T2 por T1. La Figura 25D proporciona la clave de colores para los nucleótidos en la Figura 25C usando las abreviaturas definidas en la Figura 3B. El enlace negro con extremos redondos indica el apareamiento de bases intermolecular.

30 Las secuencias de ARN de transferencia informadas hasta la fecha con construcciones P54-P55 incluyen, pero no se limitan a, ARNt<sup>T<sub>TP</sub></sup> de células de pollo infectadas con el virus de la mieloblastosis aviar (AMV) (Hu et al., 1983, Nucleic Acids Res., 11:4823) y ARNt<sup>Pro</sup> de células de ratón infectadas con el virus de la leucemia murina (MLV) (Harada et al., 1979, J. Biol. Chem., 254:0979). Ambos de estos virus son retrovirus.

35 La Figura 26 es una tabla de control lógico para operaciones de nucliones y resume los estados de los sitios TLS izquierdos y derechos, conducidos en parte por los nucleósidos en las posiciones 54 y 55 en un ARNt T(N), junto con las condiciones de nucliones asociadas y resultantes. T(N-1) se refiere al ARNt adyacente inmediatamente en la dirección 5' de ARNt (N) y T(N+1) se refiere al ARNt adyacente inmediatamente en la dirección 3' de ARNt (N). ARNt (N+2) es el ARNt inmediatamente en la dirección 3' de ARNt (N+1). Esta tabla de lógica de nucliones puede emplearse para diseñar, desarrollar, fabricar, utilizar y usar nuevos productos y servicios biofarmacéuticos.

#### Modulación de TLS

45 Pueden emplearse compuestos naturales y no naturales como agonistas o antagonistas de estructuras y actividades de nuclión particulares, entre otras cosas, para alterar la formación de nucliones, modular los efectos biológicos asociados y tratar trastornos médicos mediados por nucliones. Estos compuestos pueden diseñarse para unirse a, o competir con, dianas de nuclión en las estructuras de TLS y/o TC, o un subconjunto de tales estructuras.

50 En su función de sitio de ribozima original para la transferencia de peptidilo, el sitio PLS ancestral en la tapa de ARNt1 fue capaz de unirse a la cola CCA de ARNt2 (con su cadena de polipéptidos en crecimiento) principalmente a su lado izquierdo, mientras que la cola CCA de ARNt3 (con el siguiente aminoácido) se une principalmente a su lado derecho. El lado derecho del PLS también se usó, ya que el lado derecho del TLS normalmente se usa hoy en día, para enlaces rutinarios entre moléculas de ARNt adyacentes en la ribocápside. La capacidad crucial de la  
55 interacción TLS-TC para unirse a ARNt de ribocápside adyacentes explica la sustancial conservación de los ocho nucleósidos GSP90 en toda nuestra biosfera. La comparación de esta subestructura de ARNt con el sitio de transferencia de peptidilo en ARN 23S en ribosomas 70S indica que, cuando los nucliones condujeron la síntesis de proteínas en la evolución temprana, la purina R57 conservada en ARNt puede haber servido de catalizador para la transferencia de peptidilo. Al igual que A2602 ribosómico, esta purina no está unida a hidrógeno, pero está localizada estratégicamente dentro de una hélice de ARN que evolucionó originalmente para mantener dos A76s de otros dos ARNt. A diferencia con el A2602 ribosómico que sobresale, sin embargo, R57 observado en estructuras cristalinas de ARNt está apilado dentro de su hélice parental.

65 Los estudios de modelado informático de los presentes inventores indican que, en la formación de nucliones contemporáneos normales, A76 de 3' en un ARNt de ribocápside se une a P55 en el lado derecho del TLS en el ARNt adyacente a 5', pero los estudios no identificaron un sitio TLS abierto para la unión de C74 y C75 del ARNt

adyacente a 3'. G18 y G19 en el TLS están próximos a C74-C75, pero están de otro modo comprometidos en la unión de la pila de TLS, al menos en las estructuras cristalinas de ARNt informadas hasta la fecha, sustancialmente todas las poliaminas empleadas para la cristalización. Es probable que estas poliaminas bloquearan el sitio TLS en una conformación similar a la presentada para la unión de T2 en la síntesis de proteínas primordiales, previniendo así la unión de T2 de tipo ribocápside contemporánea por el TLS.

La evidencia de este bloqueo de poliamina del sitio TLS procede de los estudios estructurales de rayos X de cristales de ARNt con espermina, una de las poliaminas que es normalmente requerida para la cristalización de ARNt (Dock et al., 1984, *Biochem.*, 66:179). La Figura 27A muestra el sitio de unión de espermina de una estructura de alta resolución informada para ARNt<sup>Phe</sup> de levadura (Jovine et al., 2000, *J. Mol. Biol.* 301:401), cuando se ve desde la izquierda del TLS. La Figura 27B es la misma estructura cuando se ve desde el extremo del TLS.

La espermina está unida en gran parte por los nucleósidos T54 y P55 en el lado izquierdo del sitio de enlace de ARNt, de acuerdo con el bloqueo conformacional del TLS. Dada la flexibilidad informada de la región de codó de ARNt en solución, tal bloqueo conformacional puede ser esencial para la cristalización de ARNt. Una consecuencia no intencionada de tal bloqueo de poliamina es la distorsión del lado derecho del TLS normalmente empleado en la formación de ribocápsides. El TLS probablemente tiene una o más conformaciones alternativas no observadas en estructuras cristalinas de ARNt, en las que el TLS G18 y G19 se unen a C75 y C74, respectivamente, en el ARNt adyacente a 3', con la protuberancia simultánea de R57 similar a la observada para A2602 en el ribosoma 70S. Esta perspectiva sugiere que poliaminas tales como espermina inhiben la formación de ribocápsides y su inclusión hasta ahora extendida en reactivos de laboratorio ('para estabilizar ARNt') probablemente retrasó el descubrimiento de los nucliones. Las poliaminas pueden ser específicamente excluidas de las soluciones de fabricación y mezclas de reacción predefinidas.

#### 25 Diana de nuclión

En el presente documento se describe un método de disociación de un nuclión poniendo dicho nuclión en asociación con un compuesto que se une a al menos una parte de uno o más componentes de dicho nuclión. La subestructura de nuclión que se une a uno o más de tales compuestos puede ser una diana de nuclión. Los nucliones y estructuras relacionadas fabricadas como se describe en el presente documento pueden usarse para cribar compuestos que se unen a una diana de nuclión. El compuesto empleado como agonista o antagonista de la estructura o actividad de nucliones puede ser un componente de nuclión distinto de un componente de nuclión incorporado en el nuclión elegido como diana.

En el presente documento se describe una diana de nuclión que comprende una subestructura de nuclión que está operativamente unida a la prevención, promoción, cambio, modulación o alteración de la estructura, función o actividad de un nuclión, en la que (i) una subestructura de nuclión comprende una porción predefinida de la estructura de un nuclión, sus componentes, o cualquier combinación de tales componentes, y (ii) la porción predefinida de la estructura está seleccionada del grupo que consiste en una estructura primaria, una estructura secundaria, una estructura terciaria, una estructura cuaternaria, una estructura con forma de R, una estructura con forma de S, una estructura con forma de T, una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo, y un híbrido de cualesquiera dos o más miembros de este grupo. La diana de nuclión puede seleccionarse del grupo que consiste en una diana de nuclión que no existe de forma natural en la naturaleza, una diana de nuclión aislado, una diana de nuclión purificada, una diana de nuclión amplificada, una diana de nuclión separada de componentes celulares, una diana de nuclión sustancialmente sin otra estructura de nuclión, una diana de nuclión extraída de otra estructura de nuclión, una diana de nuclión diferenciada de otra estructura de nuclión, y una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo.

La diana de nuclión puede localizarse en o sobre un nuclión seleccionado del grupo que consiste en un nuclión básico, un nuclión con envuelta, un nuclión de iniciación, un nuclión de ARNt, un nuclión de ARNt con envuelta, un nuclión normal, un nuclión anormal, un nuclión inversor, un nuclión mutante, un nuclión primordial, un nuclión natural, un nuclión no natural, un nuclión de arquea, un nuclión bacteriano, un nuclión viral, un nuclión de plásmido, un nuclión eucariota, un nuclión citoplásmico, un nuclión de plástido, un nuclión mitocondrial, un nuclión de ARNt, un nuclión de ARNt con envuelta, una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo, y un híbrido de dos o más miembros de este grupo.

La diana de nuclión, en su totalidad, en parte o partes, puede ser la totalidad, parte o partes de un miembro seleccionado del grupo que consiste en sitio de conector, sitio de enlace, conector de ARNt, sitio de enlace de ARNt, anticodón, codón, un sitio de conector unido a un sitio de enlace, un sitio de conector de ARNt y sitio de enlace de ARNt unidos juntos, un anticodón y codón unidos juntos, un sitio de conector y una estructura de ácido nucleico de núcleo a la que está unida, un sitio de conector y una estructura de ácido nucleico de núcleo a la que está unido, un conector de ARNt y la estructura de ARNm a la que está unida, un conector de ARNt y la estructura de iniciación de ARNm a la que está unida, un conector de ARNt y la estructura de Shine-Dalgarno en el ARNm a la que está unido, un conector de ARNt y la estructura de Kozak en el ARNm a la que está unido, un sitio de enlace y la estructura de ácido nucleico de núcleo a la que está unido, un sitio de enlace y la estructura de ácido nucleico de núcleo a la que está unido, un sitio de enlace de ARNt y la estructura de ARNm a la que está unido, un sitio de enlace de ARNt y la

estructura de iniciación de ARNm a la que está unido, un sitio de enlace de ARNt y una estructura de Shine-Dalgarno en el ARNm a la que está unido, un sitio de enlace de ARNt y una estructura de Kozak en el ARNm a la que está unido, bucle de pseudouridina, bucle de dihidrouridina, un bucle de pseudouridina unido a un bucle de dihidrouridina, bucle anticodón, un bucle anticodón unido a un ácido nucleico de núcleo, cola CCA, pila P, subestructura que comprende nucleótidos de ARNt de las posiciones 53 a la posición 56, subestructura de ARNt que comprende los nucleótidos G53-T54-P55-C56, subestructura de ARNt que comprende los nucleótidos G53-P54-P55-C56, subestructura de ARNt que comprende los nucleótidos de ARNt G53-T54-P55-C56 y G18-G19 y R57-A58 y C61, subestructura de ARNt que comprende los nucleótidos de ARNt G53-P54-P55-C56 y G18-G19 y R57-A58 y C61, un homólogo de uno cualquiera o más miembros de este grupo, una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo, y un híbrido de cualesquiera dos o más miembros de este grupo.

Los medios para prevenir, promover, cambiar o alterar la estructura, función o actividad de un nuclión pueden ser un medio para lograr el efecto seleccionado del grupo que consiste en prevenir la formación de nucliones, ralentizar la formación de nucliones, bloquear la formación de nucliones, permitir la formación de nucliones, promover la formación de nucliones, promover la destrucción de nucliones, desactivar la disolución de nucliones, acelerar la disolución de nucliones, cambiar la estructura de nucliones, cambiar la conformación de nucliones, romper la estructura de nucliones, modificar la estructura de nucliones, modificar un componente de nuclión, disociar uno o más componentes de nuclión, inhibir una función o actividad de nucliones, potenciar una función o actividad de nucliones, regular por disminución una función o actividad de nucliones, regular por aumento una función o actividad de nucliones, acelerar una función o actividad de nucliones, decelerar una función o actividad de nucliones, interferir con una función o actividad de nucliones, bloquear una función o actividad de nucliones, potenciar una función o actividad de nucliones, activar una función o actividad de nucliones, desactivar una función o actividad de nucliones, ajustar una función o actividad de nucliones, competir con una función o actividad de nucliones, añadir una función o actividad de nucliones, deleccionar una función o actividad de nucliones, cambiar una función o actividad de nucliones, controlar una función o actividad de nucliones, una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo, y un híbrido de cualesquiera dos o más miembros de este grupo.

Los medios anteriores para prevenir, promover, cambiar o alterar la estructura, función o actividad de un nuclión pueden seleccionarse del grupo que consiste en otro nuclión, un componente de nuclión, un agente físico, un agente químico, un agente biológico, un anticuerpo, una enzima, una ribozima, un ácido nucleico, un compuesto antisentido, un aptámero, un agente de interferencia por ARN, un agente genético, una vacuna, un agente accidental, un virus, un agente farmacéutico, un agente terapéutico, un agente profiláctico, un agente de diagnóstico, una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo, y un híbrido de cualesquiera dos o más miembros de este grupo. En el presente documento se describe un método de cribado de una diana de nuclión descrita en el presente documento sintetizando un nuclión o estructura relacionada como se describe en el presente documento, poniendo en contacto el nuclión o estructura relacionada con uno o más compuestos de la biblioteca de componentes de nuclión naturales y no naturales, e identificando aquellos compuestos que se unen y modulan la estructura y/o actividad del nuclión o estructura relacionada. Específicamente, este método puede emplearse para cribar compuestos que previenen, promueven, modulan, cambian o alteran la estructura, función o actividad de un nuclión. Este método puede realizarse *in vitro* para cribar componentes de nuclión naturales y no naturales que previenen, promueven, modulan, cambian o alteran la estructura, función o actividad de un nuclión natural *in vivo*. Por ejemplo, cuando un nuclión o estructura relacionada sintetizada como se describe en el presente documento se pone en contacto con un componente de nuclión apropiado *in vitro*, la conformación estructural del nuclión o estructura relacionada puede alterarse, produciendo un cambio de la función o actividad del nuclión o estructura relacionada.

Los factores de elongación se unen a nucliones

El factor de elongación bacteriano EF-Tu y su equivalente eucariota eEF1A normalmente administran ARNt aminoacilados al ribosoma para la síntesis de proteínas (Mateyak et al., 2010, J. Biol. Chem., 285:21209). Los estudios de modelado informático de los presentes inventores indican que estos factores de elongación se unen a ciertos nucliones de ARNt bajo condiciones predefinidas, de acuerdo con su conducción los ARNt aminoacilados del almacén de nucliones a la factoría de ribosomas. Estos factores de elongación también desempeñan una función importante en controlar y limitar la tasa y tipo de la formación de nucliones. Un nuclión con uno o más factores de elongación unidos a su superficie es un ejemplo de un 'nuclión con envuelta' como se enseña por varias realizaciones de la presente invención, y la cubierta resultante de moléculas de factor de elongación es un ejemplo de una 'envuelta de nuclión' como se enseña por otras realizaciones.

La Figura 28 muestra un modelo informático de 12 moléculas de EF-Tu (marcadas E1 a E12) unidas a 12 ARNt en un nuclión con forma de T, que genera una cápside de proteína alrededor de la ribocápside de ácido nucleico en el nuclión. T12 indica el ARNt12 al que E12 está unido. El estudio por ordenador indicó que cada EF-Tu(N) puede también unirse a EF-Tu(N+4), donde en la dirección 3' (hacia el extremo 3' de ARNm) es la dirección positiva. No hay límite geométrico aparente al número de moléculas de EF-Tu unidas a un nuclión con forma de T (aunque, en la práctica, los factores termodinámicos limitan el número). A diferencia, hasta cuatro moléculas de EF-Tu pueden unirse cómodamente a un nuclión con forma de S (Figura 29), pero sustancialmente no más, debido a la interferencia entre EF-Tu(N) y un EF-Tu(N+4) entrante. Este límite de unión estereoquímica para EF-Tu en S-

nucliones está de acuerdo con el límite de cuatro ARNt en una S-ribocápside descrita anteriormente a partir de estudios de modelado informático.

Modelos informáticos del mecanismo por el que EF-Tu se deshace de cada ARNt aminoacilado del nuclión se muestran en la Figura 30A, Figura 30B, Figura 30C y Figura 30D. El modelo en la Figura 30A y Figura 30B muestra una conformación de pre-unión, y el modelo en la Figura 30C y Figura 30D muestra la configuración de post-unión. Estos modelos utilizan la estructura cristalina del complejo EF-Tu con ARNt<sup>Thr</sup> como se informa en 2WRN (Schmeing et al., 2009, Science, 326[5953]:688), y alinean el tallo de aminoácido de ARNt<sup>Thr</sup> con el del 3' ARNt<sup>Phe</sup> en el formato de nuclión con forma de S descrito antes. En el modelo de pre-unión, el ARNt<sup>Thr</sup> está oculto; en el modelo de post-unión el ARNt<sup>Phe</sup> está escondido.

La molécula EF-Tu está completamente localizada en la superficie externa del nuclión, de acuerdo con su función. Cuando EF-Tu se deshace del ARNt del nuclión, repliega el CCA aminoacilado del TLS en el ARNt en dirección 5' mientras que elimina simultáneamente el anticodón de ARNt de su codón de ARNm (Figura 30C y Figura 30D). La molécula EF-Tu unida al ARNt no traspasa significativamente el TLS en el ARNt relacionado, permitiendo que múltiples moléculas EF-Tu se unan simultáneamente al nuclión.

Los estudios informáticos de los presentes inventores indican que EF-Tu tiene un segundo sitio de unión de ARNt para asegurar un nuclión terminado y prevenir la síntesis de proteínas no ribosómicas con las consecuencias potencialmente negativas asociadas tratadas anteriormente. La Figura 31A, Figura 31B y Figura 31C muestran una vista paralela al eje del nuclión de un modelo informático de cómo una tapa de R-ARNt se intercala entre dos moléculas EF-Tu en el mismo nuclión. La Figura 31A muestra cuatro moléculas EF-Tu (EFTu-2 a EFTu-5) unidas a sus cuatro ARNt relacionados en un nuclión con forma de S. La Figura 31B muestra la tapa de R-ARNt (T1) añadida a esta estructura; la cola CCA-AA de esta tapa de ARNt se asienta en una hendidura en EFTu-4 (E4) unida a ARNt4. A diferencia del primer sitio de unión informado en EF-Tu, este segundo sitio se une el lado derecho del tallo de aminoacilo de ARNt1, permitiendo que ARNt1 sea firmemente intercalado entre EF-Tu-1 y EF-Tu-4 (Figura 31C). La Figura 32A, Figura 32B y Figura 32C muestran tres vistas de estas mismas estructuras cuaternarias desde la dirección 5' en el eje del nuclión, correspondientes a las tres estructuras en la Figura 31A, Figura 31B y Figura 31C. Estos complejos cuaternarios EF-Tu con el nuclión son compatibles con la estructura informada y funciones de EF-Tu, y también están de acuerdo con una función ancestral de EF-Tu como cápside de proteína que rodea el nuclión primordial. Un beneficio adicional de moléculas de Ef-Tu que rodean el ARNt de terminación es que protegen y estabilizan el enlace de aminoacilo lábil entre el aminoácido y la cola CCA en este ARNt de terminación. Ausente tal protección (y ausente la interacción con una estructura de iniciación tal como una secuencia de Shine-Dalgarno), se expone el enlace de aminoacilo en el primer ARNt (el más hacia 5') y es susceptible a la hidrólisis, mientras que tales enlaces en otros ARNt acilados en el nuclión con forma de S se protegen por unión de TLS.

Las concentraciones de tanto el ARNt como el factor de elongación EF-Tu (o la molécula equivalente eEF1A en eucariotas) son muy altas en las células. El ARNt es una de las moléculas de ARN más predominantes en la célula, normalmente segunda solo al ARN ribosómico. Hay un alto nivel de EF-Tu en células de *Escherichia coli*, frecuentemente que comprende el 5-10 % de la proteína celular total, en exceso molar significativo con respecto a los otros componentes de proteína esenciales de la maquinaria de traducción. Dado que los nucliones de ARNt pueden unirse a EF-Tu (o eEF1A, según sea aplicable), la mayoría de estos nucliones *in vivo* están recubiertos con EF-Tu (o eEF1A, según sea aplicable) dentro de la célula y proporcionan un ejemplo de nucliones con envuelta. El hecho de que la mayoría los nucliones normalmente estén recubiertos con proteínas de factor de elongación afectan las formas en las que se aíslan de fuentes naturales. Para tales nucliones con envuelta que van a purificarse, tienen que emplearse métodos moderados conocidos para aquellos expertos en la materia para retener la unión de esta cubierta de proteína a la ribocápside.

El ensamblaje de un nuclión puede aumentar significativamente el peso molecular total de la estructura cuaternaria resultante con respecto al ARN mensajero subyacente. Por ejemplo, un ARN mensajero eucariota maduro de aproximadamente 500-600 nucleótidos de longitud puede tener un peso molecular de aproximadamente 170.000. Una molécula de ARNt típica tiene un peso molecular en el intervalo 25.000 a 30.000. Por ejemplo, cuando se añaden cinco moléculas de ARNt a este ARNm (en las conformaciones R y S) para formar un nuclión pequeño, el peso molecular total del nuclión resultante es aproximadamente 300.000. Si se aplica una cubierta de factor de elongación de cinco moléculas eEF1A a este nuclión, el nuclión con envuelta obtenido tiene un peso molecular total de más de 500.000. Puede hacerse uso de estas diferencias significativas en el peso molecular total, junto con las propiedades físicas, químicas y eléctricas distintas de estas estructuras cuaternarias, para aislar y purificar nucliones y nucliones con envuelta de otros materiales.

#### 60 Simetría de nucliones

El grado y tipo de la simetría de un nuclión puede reflejar el modo en, y el grado al, que sus subunidades de ribocápside están organizadas. Las subunidades de ribocápside en un nuclión pueden disponerse simétricamente, y un nuclión tal se llama un 'nuclión simétrico'. Las subunidades de ribocápside en un nuclión pueden disponerse sin simetría y un nuclión tal se llama un 'nuclión asimétrico'. El nuclión puede contener algunas subunidades de ribocápside dispuestas con simetría y algunas subunidades de ribocápside dispuestas asimétricamente; un nuclión



tal se llama un 'nuclión parcialmente simétrico'. El nuclión puede contener subunidades de ribocápside con más de un tipo de simetría y un nuclión tal se llama un 'nuclión de simetría mixta'. Las subunidades de ribocápside en el nuclión pueden presentar simetrías sustancialmente similares a aquellas observadas en viriones (véase la sección sobre virus), pero las subunidades de ribocápside son principalmente ácido nucleico, mientras que la subunidades de cápside viral ('capsómeros') son principalmente proteína. Por ejemplo, las subunidades de ribocápside compuestas sustancialmente de moléculas de ARNt están dispuestas en un nuclión de ARNt con forma de S, en el que estas subunidades de ARN presentan simetría helicoidal alrededor de un eje de núcleo a través del ácido nucleico de núcleo. En comparación, los virus helicoidales (tales como el virus del mosaico del tabaco) normalmente están compuestos de capsómeros de proteína sustancialmente idénticos apilados alrededor de un eje en una estructura helicoidal que puede tener una cavidad de núcleo, un tubo hueco, aunque en tales virus el ácido nucleico viral no está necesariamente contenido en este tubo. En otras palabras, una referencia en el presente documento al mismo tipo de simetría o similar no requiere o implica que los diferentes componentes de una estructura tengan necesariamente las mismas relaciones espaciales o similares con respecto a cada uno.

#### 15 Diferentes tipos de nuclión

Hay diferentes tipos de nuclión. El requisito básico para la mayoría de las subunidades de ribocápside funcionales puede ser que tengan los medios para unirse simultáneamente a tanto el ácido nucleico de núcleo como otra subunidad de ribocápside. En la práctica, esto requiere que la ribocápside posea una configuración y tamaño molecular que sea compatible con ambas de estas funciones. Sin embargo, no es un requisito que la subunidad de ribocápside sea ARN de transferencia ni es un requisito que su estructura sea similar a la del ARN de transferencia. Los ARN de transferencia modernos han evolucionado para satisfacer múltiples funciones sustancialmente más allá de aquellas necesarias para la formación de nucliones básicos, de manera que los ARNt tienen ciertos atributos especializados y elementos estructurales asociados, que no son esenciales para la formación de nucliones. Además, no es esencial para la formación de nucliones que las subunidades de ribocápside se apilen en la misma dirección helicoidal, ni en la misma orientación 5' a 3', como las moléculas de ARN de transferencia naturales. Las subunidades de ribocápside pueden ser más pequeñas o más grandes que las moléculas de ARNt, y tienen formas sustancialmente diferentes de los ARNt. Aunque la subunidad de ribocápside (unidad N de ribocápside) puede unirse a subunidades de ribocápside adyacentes (N+1 y/o N-1), las subunidades de ribocápside pueden unirse a subunidades de ribocápside no adyacentes (por ejemplo: N+2 y/o N-2; N+3 y/o N-3; etc.).

Tanto el anticodón como el codón pueden tener tres nucleótidos de longitud. Sin embargo, esta longitud no es un requisito para la formación de nucliones. La longitud del anticodón y el codón son más o menos de tres nucleótidos (por ejemplo, cuatro nucleótidos). Además, no es un requisito que el anticodón y el codón estén compuestos de nucleótidos naturales. De hecho, puede desearse usar nucleótidos no naturales con el fin de conferir ciertos atributos deseables a los nucliones resultantes.

El sitio de conector puede ser una cola CCA, bien con o sin un aminoácido unido. El sitio de enlace puede incluir una secuencia GTPC. Sin embargo, ninguna de estas estructuras es un requisito para los enlaces entre subunidades de ribocápside. Por ejemplo, pueden emplearse estructuras moleculares que no están sustancialmente relacionadas con CCA o GTPC para enlazar subunidades de ribocápside. Puede emplearse más de un tipo de enlace entre subunidades dentro del mismo nuclión.

Las permutaciones predefinidas de estructuras de subunidad de ribocápside descritas en el presente documento, geometrías de conexión, mecanismos de enlace e interacciones codón:anticodón generan una plétora de diferentes estructuras de nuclión con una amplia variedad de aplicaciones industriales útiles.

#### Materiales y métodos para minería de datos y modelado informático

Algunos de los estudios de minería de datos de nucleósidos descritos en el presente documento se realizaron usando información de la base de datos tRNAdb mantenida por la Universidad de Leipzig en Alemania (Jühling et al., 2009, Nucleic Acids Res., 37:D159), aunque otras bases de datos se usan en otros estudios. En algunos estudios se usó información de secuencias en preferencia a información genética debido a que la primera informa de la presencia de nucleósidos modificados, aunque la información genética se emplea en otros estudios. Los algoritmos se escribieron en Microsoft Excel para calcular la prevalencia de secuencias ('SP') de cada nucleósido en cada localización de ARNt, donde la información sobre cada nucleósido no modificado o modificado fue puesta en cuarentena por separado. La SP se calculó como el número de apariciones de nucleósido en una localización de ARNt particular expresada como un porcentaje del número total de secuencias en la población (623).

Los datos de SP se asignaron y analizaron con las siguientes cohortes cuando fuera aplicable y estuvieran disponibles: [elongador o iniciador] y [arquea, bacterias, eucariotas o virus] y [citoplasma o orgánulo]. Los resultados de SP no se normalizaron, debido a que todas las cohortes no estuvieron adecuadamente representadas o, en algunos casos, no se representaron en absoluto. En consecuencia, los resultados estuvieron inevitablemente sesgados estadísticamente por la representación de secuencias desproporcionada por cohorte, reflejando la población de secuencias contribuidas a la base de datos tRNAdb.

Se construyeron topogramas de prevalencia por cohorte proyectando resultados de SP sobre la arquitectura de ARNt<sup>Phe</sup> de levadura (PDB: 1EHZ) (Shi et al., 2000, ARN, 6:1091), ya que su estructura ha sido determinada en estudios de cristales por laboratorios independientes a la resolución más alta de cualquier ARNt. No estuvieron disponibles estructuras cristalinas para cada cohorte, por lo que se usó la estructura secundaria conservada para guiar a la conservación de estructura terciaria, todo sujeto a las excepciones indicadas anteriormente.

Algunos de los estudios del modelo informático referenciados en este documento se realizaron usando el programa informático PyMOL versión 1.2r3pre (Schrodinger LLC; PyMOL por Surhone et al., VDM Publishing House, 2010), aunque se emplea otro software en otros estudios. La estructura de ARNt<sup>Phe</sup> de levadura era la plataforma arquitectónica para la mayoría de los modelos; otros ARNt se sustituyeron o añadieron dependiendo del contexto. Para facilitar las investigaciones, los aminoácidos se añadieron algunas veces a estos ARNt, usando la función build de PyMOL.

La siguiente tabla contiene las diez estructuras de ARNt, determinadas a partir de estudios de cristales, que se usaron en este trabajo. Las referencias correspondientes a las ID de Protein Data Bank ('PDB') establecidas son las siguientes: CW5 y 3CW6 (Barraud et al., 2008, Nucleic Acids Res., 15:4894); 1YFG (Basavappa et al., 1991, EMBO J., 10:3105); 2TRA y 3TRA (Westhof et al., 1988, Acta. Crystallogr. A., 44:112); 1EHZ (Shi et al., 2000, RNA, 6:1091), 1EVV (Jovine et al., 2000, J. Mol. Biol. 301:401), 2WDK (Voorhees et al., 2009, Nat Struct. Mol. Biol., 5:528); 1FIR (Bénas et al., 2000, ARN, 6:1347); 3A3A (Itoh et al., 2009, Nucleic Acids Res., 37:6259).

Tabla 1: Estructuras de ARNt usadas

Fuente	Especificidad	ID de PDB
Escherichia Coli	Iniciador	3CW5, 3CW6
Levadura	Iniciador	1YFG
	Ácido aspártico	2TRA, 3TRA
	Fenilalanina	1EHZ, 1EVV, 2WDK
Tenero	Lisina	1FIR
Humana	Selenocisteína	3A3A

Se emplearon las estructuras del ribosoma de *Thermus thermophilus* informadas como 2WDG-N (Voorhees et al., 2009, Nat Struct. Mol. Biol., 5:528), 3I8F-I y 3I9B-E (Jenner et al., 2010, Nat. Struct. Mol. Biol., 17:555) para el trabajo en el ribosoma 70S. Se usó la estructura codón-anticodón informada en 2WDK para el ARNt en el sitio A para la conformación L del bucle anticodón. El modelado con EF-Tu de *Thermus thermophilus* usó las estructuras de 2WRN (Schmeing et al., 2009, Science, 326[5953]:688).

Dada la disponibilidad limitada de estructuras terciarias relevantes, se construyeron algunos modelos informáticos consenso con componentes moleculares de diferentes especies. El alto grado de conservación de la geometría de ARNt a través de los dominios biológicos facilitó este enfoque. Las conclusiones topográficas preliminares de cierto modelado informático clave se confirmaron construyendo modelos de escala.

#### Fabricación de nucliones

Pueden fabricarse nucliones y ribocápsides a partir de moléculas de ARNt y una variedad de moléculas de ARN. En una serie de estudios de fabricación, los presentes inventores ensamblaron tales nucliones y ribocápsides, determinaron sus propiedades bioquímicas y biofísicas, y probaron su rendimiento.

#### Ejemplo 1: Estabilidad del enlace de aminoacilo

Con el fin de determinar la estabilidad de los enlaces de aminoacilo en los ARNt cargados que van a usarse como subunidades de ribocápside para la fabricación de nucliones de ARNt, los presentes inventores midieron las tasas de hidrólisis para el ARNt elongador específico de metionina ('ARNtMet') a 10 °C y 37 °C, y para ARNt específico de cisteína ('ARNtCys') a 37 °C. Los resultados se muestran en la Figura 33, donde los ejes y indican la fracción hidrolizada y los ejes x indican el tiempo en minutos. Los ARNt aminoacilados (con metionina marcada con <sup>35</sup>S o cisteína) se prepararon primero como se describe más adelante en 'Materiales y métodos para la fabricación de nucliones'. Las reacciones de hidrólisis se llevaron entonces a cabo a las temperaturas indicadas en Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Las alícuotas de reacción se inactivaron con ácido fórmico y el aminoácido libre se resolvió a partir de ARNt de aminoacilo por separación electroforética en una CCF de celulosa en condiciones ácidas. Los productos marcados con <sup>35</sup>S se visualizaron por detección de la radiactividad y se cuantificaron usando ImageQuant.

La semivida del enlace de aminoacilo en el ARNt elongador específico de metionina en estas condiciones fue aproximadamente 20 minutos a 37 °C (Figura 33A) y 100 minutos a 10 °C (Figura 33B). La semivida del enlace de aminoacilo en el ARNt específico de cisteína, en estas condiciones, fue aproximadamente 40 minutos a 37 °C (Figura 33C). Estas semividas están sustancialmente de acuerdo con los datos previamente informados y proporcionan una base para determinar si la formación de nucliones aumenta la estabilidad del enlace de aminoacilo, como se predice por el modelo de nuclión de ARNt descrito en el presente documento. La semivida de los enlaces de aminoacilo varía con el tipo de ARNt y otros aspectos de la presente descripción.

## Ejemplo 2: Efecto de la relación molar de ARNt con respecto a ARNm

Se ensamblaron nucliones de ARNt incubando relaciones molares variables de ARNt elongador específico de metionina aminoacilado ('Met-ARNteMet') con un ARNm marcado con  $^{32}\text{P}$  que contenía nueve tripletes AUG consecutivos (el codón AUG es específico para tanto los ARNt específicos de metionina elongadores como iniciadores). La secuencia de este ARNm que contiene codones de metionina ('ARNmMet'), con AUG subrayados, fue:

5' --GGG-AUG-AUG-AUG-AUG-AUG-AUG-AUG-AUG-AUG-CUU-UCU-AGG-CAC-- 3' (SEQ ID NO: 1).

Se incubaron reacciones [6  $\mu\text{l}$  en volumen con Met-ARNteMet nativo 15  $\mu\text{M}$ ,  $^{32}\text{P}$ -ARNmMet 0,0047-3,6  $\mu\text{M}$  y  $\text{MgCl}_2$  150 mM en tampón A (Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, 4 % de glicerol, 0,05 % de xileno-cianol y 0,05 % de azul de bromofenol)] durante 10 minutos a 37 °C o en un baño de hielo (4 °C). La relación molar de ARNt con respecto a ARNm se ajustó añadiendo cantidades variables de ARNmMet no marcado a mezclas de reacción que contenían una cantidad fija de ARNmMet marcado con  $^{32}\text{P}$ . Se añadieron alícuotas de 2  $\mu\text{l}$  a geles no desnaturizantes de PAGE al 12 % (8 cm x 7 cm x 0,8 mm) realizada a 200 V en tampón Tris-borato 89 mM a pH 8,3 con  $\text{MgCl}_2$  5 mM hasta que el colorante azul de bromofenol llegó a la parte inferior del gel. Un gel se sometió a electroforesis a temperatura ambiente (~45 min, 22 °C) mientras que el otro se sometió a electroforesis en una sala fría (~80 min, 8 °C). Después de secar, los geles se expusieron a una pantalla fluorescente durante 3,25 h y se visualizaron en un sistema de detección y cuantificación de radiactividad Typhoon.

La Figura 34A y Figura 34B informan de los resultados de estos geles realizados a temperatura ambiente o en sala fría, respectivamente ('Temp del gel'). Cada figura muestra el efecto de diferentes relaciones molares de ARNt con respecto a ARNm en el ensamblaje complejo a tanto 37 °C como en un baño de hielo ('Temp de reac'). El ARNm no unido migró como una banda discreta más abajo en el gel, como se confirmó por análisis independiente con el ARNm solo (experimento no mostrado). Al menos cinco bandas discretas de complejos de ARNt:ARNm fueron visibles en los geles ('Complejos 1-5'). Bandas adyacentes de complejos estuvieron sustancialmente equidistantes entre sí, de acuerdo con estructuras de nuclión de ARNt poliméricas en las que bandas sucesivas contuvieron n+1 ARNt adicionales por ARNm. Las reacciones realizadas a 37 °C dieron más nucliones que aquellas llevadas a cabo a 4 °C y la resolución electroforética de los multímeros individuales fue mejor en geles realizados en sala fría cuando se comparó con geles realizados a temperatura ambiente. Se observan diferentes efectos de temperatura en diferentes aspectos de la presente descripción.

Los datos en la Figura 34C y Figura 34D se obtuvieron cuantificando las bandas marcadas con  $^{32}\text{P}$  correspondientes a ARNm y los complejos 1-5 en la Figura 34A y Figura 34B, respectivamente, usando ImageQuant. Los resultados muestran la conversión progresiva de ARNm libre en complejos de ARNt:ARNm poliméricos a 37 °C con relaciones molares crecientes de ARNt con respecto a ARNm. A altas relaciones molares de ARNt con respecto a ARNm, sustancialmente todo el ARNm se convirtió en complejos de nuclión de ARNt poliméricos. Pareció que los geles no desnaturizantes realizados en la sala fría preservaron los complejos de ARNt:ARNm, formados a 37 °C, ligeramente mejor que las series de geles comparables a temperatura ambiente. Cuando los geles se realizaron a 8 °C, la proporción de complejos de orden superior retenida fue más alta a relaciones molares elevadas que la proporción observada en geles realizados a temperatura ambiente, donde el ensamblaje de nucliones en ambos casos se realizó a 37 °C.

El impacto de la relación molar de ARNt con respecto a ARNm sobre la tasa y el tipo del ensamblaje de nucliones varía con diferentes aspectos de la presente descripción.

## Ejemplo 3: Efecto de la concentración de magnesio

Se estudió el efecto de la concentración de cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) en el ensamblaje de los complejos de nuclión de ARNt elongador específico de metionina aminoacilado con ARNmMet marcado con  $^{32}\text{P}$  que contiene nueve codones de metionina consecutivos. La relación molar de Met-ARNteMet (15,5  $\mu\text{M}$ ) con respecto a ARNmMet (0,24  $\mu\text{M}$ ) fue 65. Las reacciones, que se llevaron a cabo en tampón A y se complementaron con las concentraciones indicadas de  $\text{MgCl}_2$ , se incubaron durante 10 min en un baño de hielo. La formación de complejos se monitorizó por análisis electroforético de alícuotas de reacción en una sala fría como se describe en el Ejemplo 2. Se detectó la radiactividad del gel secado durante 10 horas. La Figura 35A presenta la imagen del gel, que otra vez muestra la formación de bandas discretas de complejos de nuclión de ARNt:ARNm poliméricos ('Complejos 1-5'). La Figura 35B es un gráfico obtenido por cuantificación de las bandas marcadas con  $^{32}\text{P}$  correspondientes a ARNm y los complejos 1-5 en la Figura 35A usando ImageQuant. La Figura 35C es un gráfico que presenta los datos de la Figura 35B por debajo de una concentración de cloruro de magnesio 100 mM.

La unión de ARNt cargado a ARNm puede ser sustancialmente promovida por predeterminados aumentos en la concentración de  $\text{MgCl}_2$ . Se desea una concentración de  $\text{MgCl}_2$  de sustancialmente más de 100 mM para la formación de nucliones de ARNt en las condiciones probadas. Se desean diferentes concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  en otros aspectos de la presente descripción.

## Ejemplo 4: Efectos del estado de aminoacilación y reconocimiento de codones

Se estudió el impacto del estado de aminoacilación y el apareamiento anticodón:codón relacionado frente a no relacionado en el ensamblaje de nucliones comparando reacciones entre ARNm específico de metionina (ARNmMet, con nueve codones AUG consecutivos) y Met-ARNteMet nativo, ARNteMet desacilado nativo y Cys-ARNtCys nativo. Las mezclas de reacción, que contuvieron ARNt 15  $\mu$ M y ARNmMet marcado con  $^{32}$ P 4,7 nM (con una relación molar de ARNt con respecto a ARNm de 3200) en tampón A con o sin  $\text{MgCl}_2$  150 mM, se incubaron durante 10 minutos en un baño de hielo. Una alícuota de cada mezcla de reacción se sometió a electroforesis durante 80 min a 200 V en una serie de geles de PAGE al 12 % en tampón Tris-borato 89 mM a pH 8,3 con  $\text{MgCl}_2$  5 mM en la sala fría. La Figura 36 informa los resultados. Los dos primeros carriles en el gel (carriles marcados 1) contuvieron ARNm marcado con  $^{32}$ P, pero no ARNt. La adición de ya sea ARNt elongador específico de metionina nativo (carriles marcados 2) o ARNt elongador específico de metionina aminoacilado (carriles marcados 3) desencadenó una cantidad sustancial de formación de complejos de nuclión, pero no la adición de ARNt aminoacilado de cisteína (carriles marcados 4), independientemente de la presencia o ausencia de  $\text{MgCl}_2$  150 mM. El número y patrón de bandas poliméricas depende del estado de aminoacilación del ARNt. En presencia de  $\text{MgCl}_2$  150 mM y ARNt elongador específico de metionina aminoacilado, el marcador de los complejos de nuclión presenta más múltiplos de orden inferior que el marcador usando el ARNt elongador específico de metionina sin acilar nativo. Esta observación está de acuerdo con la explicación de que el nuclión con forma de T puede acomodar tanto ARNt cargado como no cargado, pero el nuclión con forma de S solo puede acomodar ARNt cargados. Esta explicación soporta el modelo de nucliones, en el que uno de los criterios de cribado en la naturaleza para añadir un ARNt a un nuclión con forma de S existente es que dicho ARNt deba cargarse con un aminoácido. Estos resultados muestran que tanto el ARNteMet cargado como no cargado pueden formar un nuclión en el ARNmMet, pero que Cys-ARNtCys, que no se unen a los codones AUG, no puede. Esto está de acuerdo con el requisito para las interacciones codón-anticodón específicas en la formación de este tipo de nuclión de ARNt. El grado y tipo de la formación de nucliones y el grado de especificidad de la interacción codón-anticodón pueden ser diferentes de los resultados descritos en este párrafo.

## Ejemplo 5: Cinética del ensamblaje de nucliones de ARNt

Se midió un transcurso de tiempo del ensamblaje complejo de nuclión de ARNt a 37 °C usando una relación molar de Met-ARNteMet con respecto a ARNmMet marcado con  $^{32}$ P (con nueve AUG consecutivos) de 3200 en tampón A con  $\text{MgCl}_2$  150 mM. En los tiempos indicados (véase 'min' en los resultados del gel en la Figura 37) se transfirieron alícuotas de la mezcla de reacción a un baño de hielo seco hasta que se descongelaron conjuntamente como un grupo y se cargaron sobre un gel de PAGE al 12 % para la separación electroforética (80 min a 200 V en tampón Tris-borato 89 mM a pH 8,3) de los componentes de reacción en una sala fría. La imagen de cuantificación de radiactividad resultante muestra que mientras que la formación de nucliones de ARNt inicial es muy rápida (1 min o menos), la aparición de estructuras de orden superior necesita algo más de tiempo. Los presentes inventores observaron que el transcurso de la reacción observado aquí debe interpretarse en vista del hecho de que la formación de complejos puede tener lugar durante el tiempo requerido para la descongelación y la carga de las muestras sobre el gel. La cinética de la formación de complejos de nuclión puede ser diferente de aquella descrita en este párrafo.

## Ejemplo 6: Disociación de nucliones por un agente que se asocia con una diana de nuclión

Nucliones y ribocápsides naturales de o en un organismo vivo pueden modularse, bloquearse, alterarse o potenciarse administrando sustancias naturales o no naturales con un medio para lograr un efecto bioquímico, fisiológico o médico predeterminado. La sustancia administrada puede diseñarse con un medio para asociarse con una diana de nuclión específica. Los nucliones elegidos como diana pueden disociarse administrando un compuesto que compite con uno o más de los componentes de nuclión, con el fin de reducir sustancialmente la concentración de nucliones así elegida como diana. En un ejemplo, los presentes inventores examinaron la cinética de disociación de nucliones de ARNt predeterminados, cuando se añadió un compuesto que comprende un medio para competir con el ácido nucleico de núcleo de los nucliones. Este medio fue un conjunto de múltiples codones en un ARN añadido que era complementario a un conjunto de anticodones en la ribocápside en el nuclión elegido como diana. En este ejemplo, este conjunto de anticodones constituye una 'diana de nuclión' y el ARN añadido es el agente eficaz.

En este ejemplo, se determinó un transcurso de tiempo para la disociación de la ribocápside formada entre Met-ARNteMet (15  $\mu$ M) y ARNmMet marcado con  $^{32}$ P (nueve tripletes AUG consecutivos; 0,0075  $\mu$ M) incubando el complejo preformado en presencia de ARNmMet frío 15  $\mu$ M (el agente de ARN) en tampón A con  $\text{MgCl}_2$  150 mM a 37 °C. Como antes, se eliminaron las alícuotas en un baño de nieve carbónica para el posterior análisis electroforético en una serie de geles al 12 % de poliacrilamida durante 80 min a 200 V y 8 °C en tampón Tris-borato 89 mM a pH 8,3 con  $\text{MgCl}_2$  5 mM. La imagen de radiactividad resultante (Figura 38A) y el transcurso de tiempo asociado (Figura 38B) demuestran que los complejos de nuclión sumados se disocian con una semivida de aproximadamente 3 min, cuando está presente un exceso sustancial de ARNmMet libre (~1000 veces la concentración de ácido nucleico de núcleo) para competir con o desplazar el ARNmMet en el nucliones. En este ejemplo, el agente de ARN añadido alteró rápidamente los nucliones uniendo a la ribocápside anticodones que

constituyen la diana de nuclión. La cinética de disociación del complejo de nuclión puede ser diferente de la descrita en este párrafo.

Ejemplo 7: Variación de la relación molar con la longitud de nuclión

En un ejemplo, los presentes inventores determinaron las relaciones molares de ARNt con respecto a ARNm en una serie de nucliones de ARNt preparando un conjunto de ARNm 42-meros de longitud fija que difirió en número de los tripletes AUG consecutivos (es decir, 1, 2, 3, 4, 6 y 9). Estos ARNm fueron marcados en el extremo 5' con  $^{32}\text{P}$  y se incubaron con Met-ARNtMet 15  $\mu\text{M}$  durante 10 min a 37 °C en tampón A con  $\text{MgCl}_2$  150 mM (la relación molar de ARNt con respecto a ARNm fue 200). Se muestra una imagen de radiactividad del gel de PAGE resultante en la Figura 39A. El número de tripletes AUG consecutivos en cada ARNm se muestra en la parte superior del gel mientras que la relación molar aparente de ARNt con respecto a ARNm en cada banda se muestra en los lados. Los resultados de un análisis de Imagequant de esta imagen de radiactividad se muestran en la Figura 39B. En el gráfico de barras adjunto, se cuantifica la fracción de cada ARNm en las bandas respectivas. Basándose en los patrones resultantes, los presentes inventores asignaron relaciones molares a las bandas multiméricas respectivas. Las relaciones molares observadas pueden indicar que la unión de un Met-ARNtMet a un único triplete AUG puede promover de algún modo la polimerización sin molde de ARNt adicionales.

Ejemplo 8: Se requiere ácido nucleico de núcleo para la formación de nucliones

Una explicación teórica pero poco probable de algunos de los complejos poliméricos que observaron los presentes inventores entre Met-ARNtMet y ARNmMet podría haber sido que el ARNt forma oligómeros de orden superior solos a los que el ARNm radiomarcado resulta asociarse. Los presentes inventores descartaron esta explicación analizando la movilidad de una serie de concentraciones de Met-ARNtMet marcado en el extremo 3' con  $^{32}\text{P}$  que había sido incubado 10 min a 37 °C en tampón A con  $\text{MgCl}_2$  150 mM. Las concentraciones de ARNt oscilaron de 0,075 a 20 micromolar ( $\mu\text{M}$  o  $\text{'uM'}$ ). Las alícuotas de reacción se sometieron a electroforesis durante 80 min a 200 V en una serie de geles de PAGE al 12 % en una sala fría con tampón Tris-borato 89 mM a pH 8,3 y  $\text{MgCl}_2$  5 mM. Una imagen de radiactividad del gel resultante se muestra en la Figura 40. Aunque las bandas correspondientes a las especies de ARNt dímero y trímero se observan en casi cada carril (de acuerdo con los informes publicados de la formación de dímero y trímero de ARNt), representan componentes menores del ARNt total (15 % y 3 %, respectivamente) y no aumentan en proporción a medida que la concentración del ARNt aumenta, a diferencia de la formación de nucliones dirigida por ARNm que conduce a un marcador bien definido de oligómeros de orden superior. En consecuencia, bajo estas condiciones, el ARNt aminoacilado no forma nucliones en ausencia de ARNm relacionado como ácido nucleico de núcleo.

Ejemplo 9: El nuclión iniciador se une a la secuencia de Shine-Dalgarno

En un ejemplo de una realización, los presentes inventores verificaron la generalidad de la formación de nucliones y examinaron si fMet-ARNtMet podía reconocer la secuencia de Shine-Dalgarno ('SD') en un ARNm, cuando el ARNt de ribocápside está unido a este ARNm. Es conocido para aquellos expertos en la materia que la secuencia SD se produce en bacterias y, cuando está presente en un ARNm, puede unirse a un ribosoma, pero no ha habido informes previos de la unión de secuencia SD a ARNt. En eucariotas tales como los seres humanos, una secuencia de ARNm análoga implicada en la traducción es la secuencia de Kozak. Sin embargo, hay diferencias significativas entre las formas en las que las bacterias y los eucariotas emplean los ribosomas para iniciar síntesis de proteínas. Aspectos en tales diferencias, que incluyen aquellos descritos en el presente documento, pueden proporcionar nuevas estrategias y herramientas médica y comercialmente importantes para diseñar, fabricar y usar novedosos compuestos farmacéuticos tales como antibióticos. Las secuencias de Shine-Dalgarno y de Kozak son ejemplos de secuencias de marcador de síntesis de proteínas, que sirven para mejorar la eficiencia, exactitud y control de la traducción en organismos celulares.

Los presentes inventores prepararon un ARNm con la siguiente secuencia:

5' --GGGAAGGAGGUAAAA-AUG-UUU-UUU-UUU-UGC-UUU-UGC-UAG-GCA-- 3' (SEQ ID NO: 2)

En este ARNm, la secuencia de Shine-Dalgarno (subrayada) está separada de los tripletes codificantes por un conector  $\text{A}_4$  (cuatro adenosinas contiguas). En la traducción, este ARNm especificaría la síntesis de un heptapéptido con la secuencia de aminoácidos fMF<sub>3</sub>CFC (formil-metionina, fenilalanina, fenilalanina, fenilalanina, fenilalanina, fenilalanina, cisteína). Después del marcado de extremos con  $^{32}\text{P}$ , este ARNm se incubó durante 10 min en un baño de hielo con diversas combinaciones de Met-ARNtMet, fMet-ARNtMet, Phe-ARNtPhe y Cys-ARNtCys en tampón B (Tris-HCl 100 mM a pH 7,5, 4 % de glicerol, 0,05 % de xileno-cianol y 0,05 % de azul de bromofenol) con  $\text{MgCl}_2$  150 mM (donde fMet-ARNtMet es el ARNt iniciador específico de metionina aminoacilado con N-formilmetionina; Phe-ARNtPhe es ARNt específico de fenilalanina aminoacilado). Cada ARNt estuvo presente a 15  $\mu\text{M}$ , produciendo una relación molar de ARNt con respecto a ARNm de 2000. Las reacciones se analizaron electroforéticamente en una sala fría como se describe en el Ejemplo 8 y una imagen de radiactividad del gel se muestra en la Figura 41.

Siempre se observa un desplazamiento sustancial en las bandas sobre el gel en las que fMet-ARN<sup>ti</sup>Met está presente. Por el contrario, un conjunto completo de ARN<sup>t</sup> cargados en el que el ARN<sup>t</sup> iniciador de metionilo se sustituyó por ARN<sup>t</sup> elongador de metionilo no mostró desplazamiento de gel significativo, que implica que fMet-ARN<sup>ti</sup>Met puede interactuar específicamente con la secuencia de Shine-Dalgarno para estabilizar el nuclión de iniciación y, posiblemente, ayudar a sincronizar el nuclión iniciador en el marco de lectura correcto.

Ejemplo 10: Efecto de la relación molar sobre el ensamblaje de nucliones iniciadores

Usando este mismo ARN<sup>m</sup> radiomarcado con la secuencia que codifica fMF<sub>3</sub>CFC descrita anteriormente, los presentes inventores examinaron el grado de formación de nucliones iniciadores cuando la relación molar de ARN<sup>t</sup> con respecto a ARN<sup>m</sup> se varió de 10 a 2000. Como antes, las reacciones se llevaron a cabo en tampón B con MgCl<sub>2</sub> 150 mM durante 10 min en un baño de hielo que empleaba 15 μM de cada uno de fMet-ARN<sup>ti</sup>Met, Phe-ARN<sup>ti</sup>Phe y Cys-ARN<sup>ti</sup>Cys. La Figura 42A presenta una imagen de radiactividad del análisis electroforético de estas reacciones llevadas a cabo como se describe en el Ejemplo 8. La Figura 42B es un gráfico del grado de formación de nucliones en función de la relación molar de ARN<sup>t</sup>:ARN<sup>m</sup>, determinado a partir de la imagen de radiactividad mostrada en la Figura 42A. La curva de unión es sustancialmente similar a la que se observó cuando Met-ARN<sup>te</sup>Met se incubó con ARN<sup>m</sup>Met, que muestra que, para las condiciones estudiadas, la cinética del ensamblaje de nucliones fue sustancialmente similar. La cinética del ensamblaje de nucliones puede variar dependiendo de las condiciones predeterminadas.

Materiales y métodos para la fabricación de nucliones

Los presentes inventores emplearon los siguientes materiales y métodos para los estudios de fabricación de nucliones de los presentes inventores, aunque pueden emplearse otros materiales y métodos.

ARN de transferencia nativos. Se compraron ARN<sup>t</sup> elongador específico de metionina (ARN<sup>te</sup>Met) de *E. coli* (1000 pmoles de actividad aceptora de metionina por unidad de A<sub>260</sub>) y ARN<sup>t</sup> específico de fenilalanina (ARN<sup>ti</sup>Phe) de levadura (1000 pmoles de actividad aceptora de fenilalanina por unidad de A<sub>260</sub>) de Chemical Block Ltd., Moscú, Rusia. Otros ARN<sup>t</sup> nativos (por ejemplo, ARN<sup>t</sup> iniciador específico de formilmetionina, ARN<sup>ti</sup>Met y ARN<sup>t</sup> específico de cisteína, ARN<sup>ti</sup>Cys) se expresaron en exceso en *E. coli* de un promotor inducible de IPTG en pKK223-3 (Liu et al., 2011, Nat Commun., 2:329). Los cultivos se mantuvieron durante 12-18 h después de la inducción para asegurar tiempo suficiente para la modificación postranscripcional del ARN<sup>t</sup> y cada ARN<sup>t</sup> se aisló como parte de un conjunto de ARN<sup>t</sup> total por lisis de fenol, seguido de una serie de precipitaciones diferenciales. Los conjuntos de ARN<sup>t</sup> se desacilaron por incubación durante 3 h en tampón Tris a pH 9,0 a 37 °C. El ARN<sup>t</sup>-Cys nativo se purificó adicionalmente por hibridación dando un oligonucleótido biotinilado complementario, seguido de captura en estreptavidina-Sepharose, lavado y liberación del soporte sólido por incubación a temperatura elevada (Yokogawa et al., 2010, Nucleic Acids Res., 38:e89).

Aminoacilación. Se expresaron eMetRS y eCysRS marcados con His recombinantes cada uno a 37 °C en BL21 (DE3) tras la inducción con IPTG 0,4 mM y se purificaron usando resina Talon, seguido de cromatografía a través de una columna Mono Q en un Akta FPLC. Se midieron las concentraciones de enzima por ensayo Bradford con BSA como patrón, y se corrigieron por ensayo de explosión de sitio activo (Fersht et al., 1975, Biochemistry 14:1). Se aminoaciló ARN<sup>ti</sup>Cys nativo (90 μM) con cisteína (180 μM) por incubación con CysRS 20 μM a 37 °C durante 10 min en Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 25 mM, ATP 2 mM. La reacción se inactivó añadiendo 0,1 volúmenes de NaOAc 2,5 M a pH 5,0 y se extrajo con un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) a pH 5,2. Después de la precipitación con etanol el ARN<sup>t</sup> se disolvió en NaOAc 25 mM a pH 5,0 y se guardó a -20 °C. La eficiencia de carga se determinó incluyendo una pequeña cantidad de <sup>3</sup>H-cisteína en la reacción. Tras la precipitación con etanol se centrifugó una alícuota del ARN<sup>t</sup> cargado a un cartucho de filtración en gel Centrspin-20 (Princeton Separations) para asegurar la eliminación completa de aminoácido libre y ATP. A partir de A<sub>260</sub> y tritio pudieron calcularse los recuentos del flujo a través de la fracción de ARN<sup>t</sup> cargado. Se preparó Cys-ARN<sup>ti</sup>Cys marcado con <sup>35</sup>S nativo reemplazando <sup>3</sup>H-cisteína con <sup>35</sup>S-cisteína en la reacción de carga. La carga de ARN<sup>te</sup>Met nativo y ARN<sup>ti</sup>Met se llevó a cabo en modo similar usando MetRS en presencia de <sup>3</sup>H-metionina o <sup>35</sup>S-metionina. La formilación de Met-ARN<sup>ti</sup>Met se realizó al mismo tiempo que la aminoacilación, incluyendo metionil formil transferasa y N<sup>10</sup>-formiltetrahidrofolato en la reacción.

El Met-ARN<sup>t</sup> elongador se marcó en el extremo 3' por incubación del ARN<sup>t</sup> desacilado con enzima de adición de CCA en presencia de CTP 5 mM y una cantidad limitante de α-<sup>32</sup>P-ATP. El ARN<sup>t</sup> marcado se extrajo con fenol, se centrifugó a través de un cartucho Centrspin-20 y precipitó en etanol. El ARN<sup>t</sup> recuperado se cargó como se ha descrito anteriormente.

Se cargó el ARN<sup>t</sup><sup>Phe</sup> de levadura nativo usando eFx flexizyme en presencia de Phe-CME como se describe por Murakami (Murakami et al., 2006, Nat. Methods, 3:357). La eficiencia de carga se determinó por electroforesis del ARN<sup>t</sup> aminoacilado en un gel de PAGE desnaturalizante al 12 % después de la biotinilación y la adición de estreptavidina, como se describe por los mismos autores.

Preparación de ARN mensajeros. Se prepararon ARNm por transcripción *in vitro* usando moldes de ADN bicatenario sintético que contuvieron un promotor para ARN polimerasa T7. Los transcritos se purificaron por electroforesis a través de un gel de urea 7 M-12 % de poliacrilamida desnaturante. Las bandas se visualizaron por ensombrecimiento UV y se extrajo ARNm en tampón TE por agitación durante la noche. El ARNm se precipitó en etanol del sobrenadante clarificado y se guardó en TE a -20 °C. Los ARNm se marcaron en el extremo 5' incubando primero con fosfatasa alcalina de gamba, seguido de tratamiento con T4 cinasa en presencia de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP o  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-GTP. Se eliminaron los recuentos libres por precipitación con etanol y centrifugación a través de un cartucho Centriscin-20.

Separaciones electroforéticas. Se separaron <sup>35</sup>S-Met-ARNtMet y <sup>35</sup>S-Cys-ARNtCys del aminoácido libre por CCF electroforética sobre hojas de plástico revestidas con celulosa ejecutadas en tampón piridina-acetato a pH 2,8 (Zaher et al., 2009, Nature, 457:161; Youngman et al., 2004, Cell, 117:589). Los nucliones se resolvieron a partir de ARNm marcado con <sup>32</sup>P por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % realizada en tampón Tris-borato a pH 8,3 con MgCl<sub>2</sub> 5 mM. El análisis de Met-ARNtMet marcado con <sup>32</sup>P para la formación de oligómeros se llevó a cabo usando el mismo sistema de geles. Estos geles (normalmente 6,5 cm x 8 cm x 0,75 mm) se realizaron a 200 V en una sala fría o a temperatura ambiente hasta que el azul de bromofenol alcanzó la parte inferior del gel. Tras la electroforesis, los geles se secaron sobre papel de filtro a vacío. Las bandas marcadas con <sup>32</sup>P se visualizaron por un sistema de detección y cuantificación de radiactividad y su intensidad se determinó usando el software Imagequant. Se analizaron CCF de un modo similar. Para una visión general de los métodos de electroforesis en gel aquí empleados, véase Sambrook y Russell (Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York).

#### Procesos de fabricación

Pueden fabricarse nucliones: (i) purificando nucliones naturales (el material resultante se llama en el presente documento un 'nuclión biológico' o 'nucliones biológicos'), o (ii) ensamblando nucliones de componentes naturales o sintéticos (el material resultante se llama en el presente documento un 'nuclión sintético' o 'nucliones sintéticos'). 'Purificar nucliones naturales' significa aislar nucliones de componentes celulares con los que están asociados cuando están presentes dentro de células o lisados celulares. La purificación también puede incluir preparar una preparación de nucliones homogénea de las mismas o sustancialmente las mismas composiciones. La fabricación de nucliones biológicos puede implicar aislar nucliones naturales de un organismo, producto biológico, cultivo celular o fuente de fermentación y purificarlos a un grado adecuado para su uso previsto. La fabricación de nucliones sintéticos puede implicar combinar una molécula de ácido nucleico de núcleo con moléculas de ácido nucleico de ribocápside. Tanto los nucliones biológicos como sintéticos pueden someterse a etapas de fabricación adicionales, que incluyen purificación y modificación adicional. Las preparaciones de nuclión resultantes pueden ser homogéneas (en las que sustancialmente todos los nucliones tienen la misma composición) o heterogéneas (que contienen una mezcla de nucliones con diferentes composiciones).

Una persona experta en la técnica química, biológica y farmacéutica para ácidos nucleicos estará familiarizada con los procedimientos para aislar o fabricar los dos materiales de partida primarios para la producción de nucliones, las moléculas de ácido nucleico para su uso en el núcleo de nuclión y las moléculas de subunidad para su uso en la ribocápside (Vomelová et al., 2009, Folia. Biol. Praha, 55:243; Tan et al., 2009, J. Biomed. Biotechnol., 2009:574398). El ácido nucleico de núcleo ('CNA') puede ser ARN monocatenario. Alternativamente, puede usarse ADN monocatenario. Pueden usarse una o más especies de ARN de transferencia para las subunidades de ribocápside. También puede usarse otras formas de ácido nucleico. Las estructuras primaria, secundaria y terciaria de las subunidades de núcleo y de ribocápside pueden ser aquellas encontradas en la naturaleza, o no, o una mezcla de las mismas. Las subunidades de núcleo y de ribocápside pueden extraerse de fuentes naturales, producirse sintéticamente, u obtenerse de una combinación de materiales naturales y sintéticos. Las subunidades de núcleo y de ribocápside pueden ser cadenas de nucleótidos naturales, nucleótidos no naturales, nucleótidos naturales modificados, análogos de nucleótidos, sustitutos de nucleótidos, cualquier combinación de los mismos o cualquier híbrido de los mismos. Los esqueletos de las subunidades de núcleo y de ribocápside pueden ser (i) los esqueletos encontrados en ácidos nucleicos en la naturaleza en ADN o ARN, o cualquier combinación de los mismos; (ii) esqueletos no naturales, modificaciones de esqueletos naturales, análogos de esqueletos naturales, sustitutos de esqueletos naturales o cualquier combinación de los mismos; (iii) cualquier combinación de esqueletos naturales y no naturales; o (iv) cualquier híbrido de esqueletos naturales y no naturales. Los métodos usados para preparar o modificar los polímeros de nucleótidos, sus análogos o sustitutos, que constituyen los materiales de partida para la producción de nucliones, pueden emplear procesos naturales o no naturales o cualquier combinación de los mismos.

Donde moléculas de ARN de transferencia se emplean para las subunidades de ribocápside, tales moléculas de ARNt están en una forma encontrada en la naturaleza, o en una forma no encontrada en la naturaleza, o una combinación, híbrido o mezcla de los mismos. Tales moléculas de ARNt naturales incluyen todas las moléculas de transferencia encontradas en la naturaleza, que incluyen, pero no se limitan a (i) todas las especies de ARNt con especificidad de aceptor por cualquier aminoácido encontrado en la naturaleza en cualquier dominio biológico o virus u otra forma de vida; y (ii) todas las clases de ARNt, independientemente de si son o no moléculas de iniciación para reconocer codones de iniciación, moléculas de elongación para contribuir a aminoácidos adicionales, moléculas de

cebador para actividad enzimática, o moléculas que sirven a alguna otra función. Los ARNt no naturales incluyen, pero no se limitan a, cualquier molécula de ARNt que (i) tenga una longitud o cualquier porción de su secuencia de nucleótidos diferente de la de un ARNt natural completo, (ii) incluye uno o más nucleótidos que es diferente de los encontrados en la naturaleza en la misma localización, (iii) tiene, en su totalidad o parte, un tipo de esqueleto o modificación diferente de la encontrada en la naturaleza en la misma localización, (iv) tiene cualquier extensión o deleción de uno o más nucleótidos hacia o desde la secuencia de nucleótidos encontrada en la naturaleza, o (v) tiene cualquier modificación o reticulación hacia o entre cualquier parte de la molécula de ARNt no observada en la naturaleza en esa localización. Los nucliones pueden prepararse usando ARNt de las especies en o para las que el nuclión pretende usarse, o especies distintas de las especies en o para las que el nuclión pretende usarse, o una mezcla de ARNt de diferentes especies. Los ARNt para la producción de nucliones pueden estar limitados a aquellos encontrados en las especies en las que o para las que el nuclión pretende usarse, con el fin de minimizar o reducir la inmunogenicidad, pirogenicidad u otro efecto secundario del nuclión derivado.

Una o más moléculas de subunidad de ribocápside ('RSM'), que incluyen, pero no se limitan a, una o más moléculas de ARNt, pueden conjugarse con un aminoácido, un precursor de un aminoácido o un aminoácido modificado, antes de que las subunidades de ribocápside se usen para preparar nucliones. Un experto en las técnicas química, biológica y farmacéutica, como se aplican a aminoácidos y ácidos nucleicos, estará familiarizado con los procedimientos para aislar, fabricar y modificar aminoácidos, y conjugarlos o sus precursores con ácidos nucleicos. Tales aminoácidos para la conjugación pueden ser (i) aminoácidos que se usan en la naturaleza para la síntesis de proteínas ('traducción') que incluyen, pero no se limitan a, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ornitina, fenilalanina, prolina, pirrolisina, selenocisteína, serina, taurina, treonina, triptófano, tirosina y valina (individualmente y conjuntamente 'aminoácidos estándar'); (ii) aminoácidos 'no estándar' que se producen en la naturaleza como resultado de la modificación postraduccional u otro proceso biológico; (iii) aminoácidos estándar o no estándar sintéticos y modificados no encontrados en la naturaleza; o (iv) un precursor o combinación de cualquiera de los aminoácidos en tales categorías (i), (ii) o (iii). El aminoácido puede conjugarse con el extremo 3' del ARNt y el conjugado se usa como subunidad de ribocápside. El aminoácido conjugado con el extremo 3' de la molécula de ARNt puede ser un aminoácido estándar o su precursor, para el que tal molécula de ARNt es específico (el 'aminoácido usual') en la naturaleza.

Átomos, moléculas, macromoléculas, polímeros o restos distintos del aminoácido usual (individualmente y conjuntamente, 'sustitutos de AA') pueden conjugarse con una o más moléculas de ácido nucleico de ribocápside (que incluyen, pero no se limitan a, moléculas de ARNt de ribocápside), en lugar de, además de o en ausencia del aminoácido usual. Un sustituto de AA puede ser él mismo un aminoácido, a condición de que no sea el aminoácido usual. Un sustituto de AA puede estar covalentemente unido al extremo 3' de una molécula de ARNt. El sustituto de AA unido al extremo 3' de la molécula de ARNt puede ser un aminoácido estándar distinto del aminoácido usual. Los sustitutos de AA pueden usarse, entre otras cosas, para aumentar, disminuir o modular la cantidad, calidad o estabilidad de los enlaces (que incluyen, pero no se limitan a, los enlaces TC-TLS) entre ARNt adyacentes en la ribocápside, y para conferir atributos particulares en la ribocápside, el nuclión o ambos.

El enlace químico usado para conjugar el aminoácido o un sustituto de AA con un ARNt puede ser el enlace de éster usado en la naturaleza, o cualquier otro enlace de éster o enlace químico natural o no natural que incluye, pero no se limita a, un enlace de amida. Este enlace de conjugación puede ser un enlace de éster entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el hidroxilo en 2' o 3' en el anillo de azúcar del nucleótido de adenosina en la posición del extremo 3' en el ARNt. Los enlaces de conjugación pueden formarse usando enzimas naturales específicas para el fin, que incluyen, pero no se limitan a, aminoacil sintetetas (Ibbaa et al., 2001, *EMBO Rep.*, 2:382), o por métodos de química orgánica o inorgánica, con o sin el uso de un catalizador dedicado.

La combinación de un ácido nucleico de núcleo no modificado con subunidades de ribocápside no modificadas se llama en el presente documento un 'nuclión básico'. Moléculas y modificaciones distintas de aquellas que existen en un nuclión básico pueden añadirse o hacerse en el nuclión básico para cambiar su estructura o función o ambos (tras lo cual, el nuclión resultante se llama en el presente documento un 'nuclión complejo'). Tales moléculas y modificaciones adicionales pueden incluir, pero no se limitan a (i) la adición de una o más moléculas (que incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, polímeros, restos químicos pequeños u otras moléculas) para unirse a una porción de la molécula de ácido nucleico de núcleo no implicada en la unión de subunidades de ribocápside, en la que la unión de tales moléculas adicionales se logra por enlace de hidrógeno, apilamiento de pares de bases, enlace covalente, interacción iónica o de otro modo); (ii) la adición de una tapa química a o modificación de los extremos 5' o 3' de la molécula de ácido nucleico de núcleo (o ambos de tales extremos), en la que una tapa tal puede ser cualquier sustancia química o material (que incluye, pero no se limita a, una tapa en 5' de guanosina metilada, una tapa en 5' de trifosfato terminal o una cola de poli(A) en o cerca del extremo 3'), que está unida mediante cualquier medio y está prevista para cualquier fin (que incluye, pero no se limita a, ajustar la semivida, susceptibilidad enzimática o transporte del nuclión o sus componentes); (iii) la conjugación de moléculas adicionales con ácidos nucleicos de ribocápside, más allá de los aminoácidos anteriormente mencionados, sus precursores, modificaciones y sustitutos; (iv) el tratamiento adicional de, recubrimiento de, o la provisión de una envuelta para, el nuclión, la ribocápside o el ácido nucleico de núcleo por, o una combinación del nuclión con, un material natural o no natural (que incluye, pero no se limita a, una proteína,



hidrato de carbono, lípido, colesterol, ácido nucleico, polímero sintético, liposoma, agregado, dispersante, agregado, atrayente, repelente, adyuvante, material fluorescente, material magnético, material radiactivo, material radiopaco, metal, celulosa, sílice, plástico, o cualquier otro material orgánico o inorgánico); (v) la modificación del diseño o la fabricación de uno o más de los componentes de ácido nucleico en el nuclión básico que produce estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria adicional (que incluye, pero no se limita a, la introducción de una doble hélice, triple hélice, tallo, bucle, tallo-bucle, horquilla, pseudonudo, tetrabucle, riboswitch, ribozima, secuencia de poliadenosina, secuencia de Shine-Dalgarno o secuencia de Kozak); y (vi) la conexión, inclusión, incorporación, introducción, mezcla, asociación o co-administración de moléculas adicionales o componentes moleculares que afectan o actúan en cooperación con la estructura o función de un nuclión, que incluyen, pero no se limitan a, ARN monocatenario, ARN bicatenario, ARN codificante, ARN no codificante, ARN mensajero, intrones, exones, ARN de transferencia, ARN ribosómico, ARN de ribozima, ARN antisentido, ARN sentido, ARN no codificante, ARN regulador, microARN, ARN interferente pequeño, ARN nuclear pequeño, ARN nucleolar pequeño, espliceosoma, ADN monocatenario, ADN bicatenario, combinación de ADN y ARN, aptámero, material de intercalación, virus, componente viral, ARN viral, ADN viral, proteína, enzima, histona, anticuerpo, factor de iniciación, factor de elongación, factor de terminación, factor de traducción, lípido, hidrato de carbono, compuesto de control o cualquier otro átomo bioquímico, químico o inorgánico, elemento, molécula, compuesto, material o precursor para cualquier molécula enumerada en este párrafo; o (vii) cualquier combinación, híbrido o mezcla de las moléculas o modificaciones expuestas en las frases precedentes (i) a (vi).

Los nucliones complejos pueden tener, pero no se limitan a, una o más de las siguientes propiedades:

- (i) El ácido nucleico de núcleo usado para preparar el nuclión es una molécula de ARN monocatenario con una tapa química en el extremo 5';
- (ii) El ácido nucleico de núcleo usado para preparar el nuclión es una molécula de ARN monocatenario con una tapa química en el extremo 3';
- (iii) El ácido nucleico de núcleo usado para preparar el nuclión es una molécula de ARN monocatenario con una cola de poli(adenosina) en el extremo 3', que está opcionalmente adicionalmente modificada para resistir a la degradación y mejorar el rendimiento de nucliones;
- (iv) El ácido nucleico de núcleo usado para preparar el nuclión es una molécula de ARN monocatenario con una tapa química en el extremo 5' y una cola de poli(A) en el extremo 3';
- (v) El ácido nucleico de núcleo es una molécula de ARN monocatenario diseñada con un bucle de horquilla de auto-hibridación en el extremo 5' para mejorar la estabilidad y el rendimiento de nucliones;
- (vi) Una molécula de ARN de núcleo está parcialmente encerrada por subunidades de ribocápside, y la molécula de ácido nucleico de núcleo restante no está unida a subunidades de ribocápside;
- (vii) Una molécula de ARN de núcleo está parcialmente encerrada por subunidades de ribocápside, y la molécula de ácido nucleico de núcleo restante contiene uno o más 'componentes de ARN inteligentes', cuyas realizaciones incluyen, pero no se limitan a, ribozima, riboswitch, aptámero, espliceosoma, secuencia de poli(A) o cualquier otro componente de ARN o estructura que tenga un efecto biológico;
- (viii) Una molécula de ARN de núcleo está parcialmente unida a ácidos nucleicos de ribocápside, y una o varias de otras moléculas de ácido nucleico complementarias a parte o todo el resto del ácido nucleico de núcleo están unidas a dicho ácido nucleico de núcleo restante;
- (ix) Una molécula de ARN de núcleo está parcialmente unida a subunidades de ribocápside, y una o varias de otras moléculas de ácido nucleico complementarias a parte o todo el ácido nucleico de núcleo restante están unidas a ella, en la que esta otra molécula de ARN contiene uno o más componentes de ARN inteligentes; o
- (x) El ácido nucleico de núcleo o uno o más de los ácidos nucleicos de ribocápside se marcan con un material radiactivo o radiopaco antes o después de la fabricación de nucliones.

#### Factores de diseño de nucliones

Los materiales de partida seleccionados para la fabricación de nucliones, el ácido nucleico de núcleo y los ácidos nucleicos de ribocápside (tanto si están modificados como si no, como se expone anteriormente), pueden cumplir sustancialmente los siguientes criterios de aceptación: (i) la molécula de ácido nucleico de núcleo ('CNA') debe incluir, como una porción o totalidad de su estructura, una región con sitios de unión múltiples ('codones') con los que se unen los ácidos nucleicos de ribocápside; (ii) todas las subunidades de ribocápside deben incluir al menos un sitio de unión ('anticodón') para unirse a un codón en el CNA; (iii) la mayoría de las subunidades de ribocápside deben incluir al menos un sitio de enlace de ribocápside (LS) para unirse a un sitio de conector de ribocápside (CS) en una subunidad de ribocápside adyacente unida al mismo CNA; y (iv) la mayoría de las subunidades de ribocápside deben incluir al menos un CS para unirse a un LS en un ARN adyacente en la misma CNA.

Sustancialmente, todas las subunidades de ribocápside en un nuclión dado pueden unirse al ácido nucleico de núcleo, pero no todas las subunidades de ribocápside están necesariamente unidas directamente a subunidades de ribocápside adyacentes en ambas direcciones en el ácido nucleico de núcleo. Por ejemplo, como se ejemplifica en el dibujo esquemático de un nuclión con cuatro subunidades de ribocápside en la Figura 1, la subunidad de ribocápside R1 más a la izquierda solo se une directamente a una subunidad de ribocápside (R2) y la subunidad de ribocápside (R4) más a la derecha solo se une directamente a una subunidad de ribocápside (R3), mientras que las subunidades de ribocápside R2 y R3 se unen cada una directamente a dos subunidades de ribocápside. Una subunidad de

ribocápside puede no unirse a otra subunidad de ribocápside mediante el enlace CS-LS. Por ejemplo, como se ejemplifica en el modelo de un ARNt con forma de R en la Figura 14A y el dibujo esquemático de un nuclión de ARNt en la Figura 15, una molécula de ácido nucleico que termina la ribocápside en un nuclión no debe conectarse directamente a otra subunidad de ribocápside, aunque quede unida al mismo ácido nucleico de núcleo.

5 Los enlaces CS-LS pueden ser bloqueados o alterados por diseño, con el fin de modificar la estructura o función de un nuclión, como se ejemplifica en los dibujos esquemáticos de la Figura 18. Puede utilizarse el bloqueo en la dirección 5' y en la dirección 3' de los enlaces CS-LS (equivalente a enlaces TC-TLS en nucliones de ARNt) para marcar codones de iniciación en sitios de iniciación de la traducción en ARN mensajero. En un ejemplo de un bloqueo en la dirección 5', el aminoácido en el ARNt iniciador se formula para prevenir la conexión con su vecino de 10 5', forzando así al ARNt iniciador en la posición de tapa con forma de R y marcando el codón de iniciación para la síntesis de proteínas. En un ejemplo de un bloqueo en la dirección 3', el sitio LS (TLS en nucliones de ARNt) en el ARNt iniciador se modifica, con el fin de prevenir la unión del CS (CT en nucliones de ARNt) en el ARNt adyacente a 3', forzando así a este vecino en la posición de tapa.

15 Los nucliones pueden ensamblarse con una amplia variedad de estructuras, y una única estructura de nuclión puede comprender una o múltiples conformaciones de ribocápside. Por ejemplo, ejemplificado por el diseño de un nuclión que contiene múltiples conformaciones de nuclión (un 'nuclión compuesto') proporcionado en la Figura 16, se muestran tres conformaciones de nuclión diferentes combinadas para formar una estructura de nuclión de ARNt integrada. En este ejemplo de un nuclión compuesto, un ARNt con forma de R tapa el extremo 5' del nuclión, cuatro 20 ARNt con forma de S se unen juntos para formar la sección media, seguido de una serie de ARNt con forma de T en el lado 3' del nuclión. Dos ARNt aminoacilados adicionales se muestran unidos al ARNm en la dirección 3' del nuclión.

25 La Figura 17 resume las propiedades y dimensiones de la conformación de tres nucliones en este ejemplo de un nuclión de ARNt compuesto. En otro ejemplo de un nuclión compuesto, múltiples secciones de ribocápside contiguas en un único ácido nucleico de núcleo se separan con roturas estructurales. Estas roturas pueden llevarse a cabo mediante la selección de subunidades de ribocápside particulares (tales como ARNt iniciadores aminoacilados bacterianos con formil-metionina) para ajustar estas secciones de nucliones. Los sitios CS o LS en estas subunidades de ribocápside de ajuste se bloquean con el fin de prevenir la continuación de la estructura de 30 ribocápside en aquellas localizaciones.

Los nucliones pueden ensamblarse a partir de ácido nucleico de núcleo y ácidos nucleicos de ribocápside usando procesos discontinuos, continuos u otros conocidos para un experto en las técnicas farmacéutica, química y biológica por ser adecuados para la formación de complejos de ácido nucleico, a condición de que las metodologías, 35 reactivos y soluciones empleados no desnaturalicen los ácidos nucleicos y, en el caso de que se modifique cualquiera de los materiales de partida, no altere o elimine tal modificación. En la fabricación de nucliones de ARN descritos en el presente documento, pueden prepararse y mezclarse soluciones de ácidos nucleicos de ARN de núcleo y de ribocápside (que incluyen cualquier modificación a los mismos), de forma que (i) la concentración molar de cada especie de ácido nucleico de ribocápside sea más de (ii) el número de codones correspondientes en el ARN de núcleo multiplicado por la concentración molar del ARN de núcleo.

40 Los nucliones ensamblados pueden entonces separarse de los materiales de partida no unidos y purificarse por cualquiera de los métodos bioquímicos o biofísicos convencionales para el fraccionamiento de ácidos nucleicos conocidos para un experto en la materia (que incluyen, pero no se limitan a, adsorción, fraccionamiento por afinidad, centrifugación, cromatografía, cristalización, diálisis, electrolisis, electroforesis, tratamiento enzimático, evaporación, filtración, ultrafiltración, separación en gel, separación magnética, minicolumnas, separación por pH, cambio de temperatura, gradiente de sal, gradiente de disolvente, gradiente de temperatura, precipitación, separación en fase 45 sólida o fraccionamiento con disolvente).

50 En los procedimientos de fabricación, separación y purificación para nucliones, pueden emplearse condiciones que sean suficientemente no desnaturalizantes para que los ácidos nucleicos mantengan y maximicen la integridad de nucliones. Las soluciones empleadas para la fabricación, separación y purificación de nucliones pueden tener cantidades suficientemente bajas de compuestos para no interferir con la unión intermolecular dentro del nuclión, que incluyen, pero no se limitan a, niveles suficientemente bajos de compuestos que interfieren con uno o más (i) 55 enlaces LS-CS entre ARNt adyacentes en el nuclión (en una realización, tales compuestos interferentes relevantes para los nucliones de ARNt incluyen, pero no se limitan a, poliaminas tales como espermina y espermidina); (ii) enlaces codón-anticodón entre los ácidos nucleicos de ribocápside y el ácido nucleico de núcleo (en varias realizaciones, ejemplos de tales compuestos interferentes incluyen oligonucleótidos que son complementarios en su totalidad o en parte al codón o anticodón); o (iii) enlaces en un nuclión complejo entre cualquiera de las moléculas 60 añadidas y el ácido nucleico de núcleo o un ácido nucleico de ribocápside.

Los nucliones pueden diseñarse y fabricarse para contener una amplia variedad de información en sus ácidos nucleicos componentes que incluyen, pero no se limitan a, información de ADN, información de ARN, Información viral o una combinación de las mismas (individualmente y conjuntamente, llamada 'información nucleica' en el presente documento). La información nucleica puede ser almacenada en, sobre o con la molécula de ácido nucleico de núcleo. La información nucleica puede ser almacenada en, sobre o con una o más subunidades de ribocápside. 65

La información nucleica puede almacenarse tanto en, sobre o con una o más subunidades de ribocápside como en, sobre o con el ácido nucleico de núcleo.

Los nucliones de ARNt pueden fabricarse sintetizando primero una molécula de ARN de núcleo monocatenario con una secuencia de nucleótidos específica que contiene la información nucleica necesaria para una aplicación particular. Este CNA se trata entonces con moléculas de ARNt cargado con anticodones que se unen a tripletes consecutivos de los nucleótidos en el CNA, independientemente de si tales tripletes representan o no una secuencia de codones válida en la naturaleza. Los ARNt no unidos se separan entonces, dejando nucliones completados en los que la secuencia de nucleótidos en el CNA está conteniendo la información nucleica para una posterior función biológica mientras que proporciona simultáneamente sitios de unión para el ARN de ribocápside. El primer (más hacia 5') triplete de nucleótidos en el CNA que se une a un ARNt puede ser una secuencia iniciadora (que incluye, pero no se limita a, la secuencia AUG), que se une a un molécula de ARNt iniciador.

La encapsidación de la información nucleica en un nuclión puede proteger esta información y facilitar su administración a su diana prevista, no diferente de la encapsidación de un genoma viral dentro de una cápside viral, aunque la cápside de nuclión está compuesta sustancialmente de ácido nucleico mientras que la cápside viral está compuesta sustancialmente de proteína. La encapsidación de la información nucleica en nucliones puede ofrecer ventajas significativas en comparación con la encapsidación de información nucleica en viriones. Por ejemplo, los nucliones que contienen subunidades de ribocápside tales como ARN de transferencia pueden ser sustancialmente menos inmunogénicos que los viriones, en parte debido a que las cápsides de proteína usadas por los virus generalmente provocan una respuesta sustancialmente más fuerte por los sistemas inmunitarios celulares y humorales en organismos superiores tales como el hombre. Esta respuesta inmunitaria puede conducir a la destrucción o disminución del virus y su información nucleica genómica, mientras que el nuclión es más capaz de evitar tales sistemas de defensa del hospedador en los que puede describirse como un enfoque de administración de 'caballo de Troya'. El hospedador puede tratar el nuclión administrado ('no propio') como si fuera el material hospedador ('propio'), y permite que se administre al menos una porción o una porción sustancial de su información nucleica. El ácido nucleico en un nuclión de ARNt puede presentarse a la célula elegida como diana en una forma que facilita el posterior procesamiento y la activación de la información nucleica incorporada. La célula elegida como diana puede ver la estructura de nuclión como una parte normal del proceso celular, y por tanto actúa sobre ella para producir (en algunas realizaciones), para transcribir (en algunas realizaciones) o para implementar de otro modo (en otras realizaciones) la información nucleica incorporada.

Un nuclión puede fabricarse de forma que el ácido nucleico de núcleo esté solo parcialmente encapsulado con una ribocápside, dejando una o más porciones del ácido nucleico de núcleo sin una cáscara. Esta estrategia puede ser adoptada cuando se desee, entre otras cosas, que una porción del ácido nucleico de núcleo esté disponible para la interacción con otras moléculas o componentes celulares. La porción de ácido nucleico de núcleo fuera de la cáscara de nuclión puede servir como, o tener unida a ella, un aptámero para unirse a un diana celular, administrando así el ácido nucleico dentro de la cáscara, que, en una realización relacionada, se activa tras la llegada a la diana. La porción de ácido nucleico de núcleo fuera de la cáscara de ribocápside puede ser ARN monocatenario que se une antes de la administración a otra molécula de ARN para formar una estructura de ARN sustancialmente bicatenario fuera de la cáscara.

Este ARN bicatenario puede ser de una longitud, configuración y estado de modificación para funcionar como ARN interferente. La cáscara alrededor del resto del ácido nucleico de núcleo puede servir de vehículo de administración para el nuclión completo, facilitando así el direccionamiento del ARN interferente a su diana prevista. El ácido nucleico de núcleo fuera de la cáscara de ribocápside puede ser un oligonucleótido antisentido diseñado para modificar el comportamiento celular, mientras que la estructura de nuclión potencia la estabilidad del principio activo y aumenta la administración de fármaco al tejido deseado.

#### 50 Consideraciones de fabricación

Hay varios factores que afectan la eficiencia y el rendimiento del aislamiento y la síntesis de nucliones. Una consideración de fabricación importante para ciertos tipos de nuclión es la estabilidad del núcleo del ácido nucleico de núcleo y los ácidos nucleicos de ribocápside que se usan como materiales de partida.

El enlace entre la molécula de ARNt y el aminoácido unido en un ARNt de aminoácido (cargado) puede tener una semivida en solución libre de solo 20 - 30 minutos en ciertas circunstancias (Pütz et al., 1997, Nucleic Acids Res., 125:1862), tras lo cual el aminoácido es liberado. El proceso de fabricación empleado para la producción de nucliones de ARNt, en el que una cola de ARNt aminoacilado es un sitio de conector, puede ser completamente suficientemente rápido con el fin de lograr un rendimiento económicamente razonable de moléculas de ARNt aminoacilado incorporadas en nucliones completados. Donde los nucliones de ARNt se preparan a partir de ARNt aminoacilados, el nuclión en crecimiento tenderá a discriminar moléculas de ARNt no cargado sin un aminoácido, de manera que la pureza de un nuclión de ARNt tal no se reduce sustancialmente, a pesar de una reducción del rendimiento global, a condición de que queden suficientes ARNt aminoacilados limitados para completar apropiadamente el ensamblaje de nucliones. Una vez estos ARNt aminoacilados han sido incorporados en un nuclión, el enlace de aminoácido mantenido por un sitio de enlace en un ARNt adyacente puede estabilizarse y la

semivida del ARNt aminoacilado se prolonga enormemente. Sin embargo, el enlace de aminoacilo en el primer (más hacia 5') ARNt en un segmento de ribocápside no está normalmente protegido así, de manera que su semivida puede seguir siendo relativamente corta, a menos que y hasta que se establezca de alguna otra manera, por ejemplo, en una realización, uniéndose a una estructura de ARNm, tal como, pero no se limita a, la secuencia de Shine-Dalgarno. En la naturaleza, los factores de iniciación y ciertas estructuras de ARNm pueden proporcionar tal estabilización. En la fabricación de nucliones, donde el aminoácido necesita ser retenido en el primer ARNt (que no siempre es el caso), puede emplearse un enlace alternativo (que incluye, pero no se limita a, un enlace amida).

En la fabricación de nucliones, el nucleico de núcleo se une primero sustancialmente a un soporte de fase sólida (por métodos que incluyen, pero no se limitan a, adsorción, absorción, unión avidina-biotina, unión hapteno-anticuerpo, enlace covalente, enlace iónico o cualquier otro procedimiento que inmovilice sustancialmente el ácido nucleico de núcleo sobre tal soporte). Los ácidos nucleicos de ribocápside se añaden entonces para unirse sustancialmente al ácido nucleico de núcleo y los ácidos nucleicos de ribocápside no unidos al ácido nucleico de núcleo se eliminan posteriormente y sustancialmente. Finalmente, los nucliones ensamblados se eliminan sustancialmente de la fase sólida. Los expertos en las técnicas bioquímicas, biológicas, farmacéuticas y químicas están familiarizados con los métodos empleados para la administración, adsorción, conjugación, elución y fraccionamiento de moléculas de ácido nucleico y complejos de las mismas a, de y sobre tales materiales de fase sólida. La biotina puede conectarse o unirse al ácido nucleico de núcleo y se usa una columna de estreptavidina como el soporte de fase sólida. Un ácido nucleico de núcleo puede prepararse primero con un grupo de biotina fotoescindible unido a su extremo 5', realizando la transcripción de este ARN en presencia de un derivado de GMP modificado con biotina que es un sustrato para ARN-P T7; los nucliones se ensamblan, entonces la mezcla de reacción se aplica a estreptavidina-Sepharose, se lava y los nucliones purificados son liberados del soporte sólido por exposición a una cantidad predeterminada de luz a la longitud de onda correcta. Una molécula de hapteno puede conectarse o unirse al nucleico de núcleo y un anticuerpo monoclonal específico para el hapteno está unido al soporte de fase sólida. Un anticuerpo monoclonal específico para el ácido nucleico de núcleo está unido al soporte de fase sólida.

Los materiales de fase sólida empleados para tal ensamblaje de nucliones pueden ser materiales naturales o no naturales que incluyen, pero no se limitan a, material basado en sílice y recubierto con sílice, material de intercambio iónico, DEAE-celulosa benzoilada, resina, plástico, metal, hidroxiapatita, materiales magnéticos, vidrio, plástico, nailon, celulosa, geles, Sepharose, agarosa, columna de estreptavidina y construcciones modificadas de tales materiales). Las metodologías empleadas para tal ensamblaje de fase sólida de nucliones incluyen, pero no se limitan a, química de lotes, centrifugación, cromatografía en columna, separación magnética, gradiente de temperatura, gradiente de disolvente, gradiente de sal, gradiente de pH, electroforesis, filtración o cualquier otro método que separe material no unido de material unido a la fase sólida o viceversa.

En el ensamblaje en fase sólida de nucliones, el ácido nucleico de núcleo puede aislarse o fabricarse para incluir una secuencia de poli(A), preferentemente pero no necesariamente en o cerca de la cola 3' del ácido nucleico de núcleo. La fase sólida es una resina a la que los oligómeros de desoxitimidina oligo(dT) se han unido, de forma que sustancialmente solo el ARN que tiene una cola de poli-A se unirá a la resina (Aviv et al., 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69:1408). Esta resina se carga con el ácido nucleico de núcleo, luego se expone a una solución o soluciones de ácidos nucleicos de ribocápside (por ejemplo, pero no se limita a, ácidos nucleicos tales como ARNt y ARNt aminoacilados). Los ácidos nucleicos de ribocápside no unidos se separan de los nucliones unidos a la resina por elución, centrifugación, separación magnética u otros medios. Los nucliones son entonces liberados de la resina ajustando el entorno químico o físico de la resina, o introduciendo moléculas tales como oligonucleótidos que desplazan los nucliones de sus sitios de unión en la resina. La cromatografía en una columna de celulosa oligo(dT) es una realización de preparación a gran escala de nucliones ensamblados a partir de ácido nucleico de núcleo que contiene una secuencia de poli(A). Debe observarse que los ARN mensajeros en el citoplasma de la mayoría de los eucariotas tienen una cola de poli(A), pero no los ARNm en células bacterianas y orgánulos en eucariotas relacionados. En consecuencia, el uso de tales columnas de oligo(dT) es una opción para la preparación de nucliones y ribocápsides para su uso en organismos eucariotas tales como animales y seres humanos.

Puede sintetizarse un polinucleótido que es complementario a una porción del ácido nucleico de núcleo ('CNA') que no está previsto para la formación de ribocápside (una 'sonda de CNA'). Entonces, la sonda de CNA se inmoviliza sobre un soporte de fase sólida u otro dispositivo de separación, después de lo cual el ácido nucleico de núcleo se aplica al soporte o dispositivo, dejando expuestos los sitios de unión para las subunidades de ribocápside. Se elimina el ácido nucleico de núcleo no unido, las subunidades de ribocápside se aplican a la columna para formar nucliones, entonces se eliminan las subunidades no unidas. Finalmente, los nucliones ensamblados se eluyeron por rotura de los enlaces entre CNA y la sonda de CNA, usando un método que retiene la integridad de los nucliones. La biotina puede conjugarse con la sonda de CNA. La sonda de CNA conjugada con biotina se inmoviliza entonces sobre una columna de estreptavidina. El ácido nucleico de núcleo se aplica entonces a la columna, tras lo cual una porción del CNA se une a la sonda de CNA. Las subunidades de ribocápside se aplican entonces a la columna, tras lo cual los nucliones ensamblados son retenidos por la fase sólida. Finalmente, los nucliones ensamblados se eluyeron de la columna cortando los enlaces entre el CNA y el polinucleótido complementario inmovilizado. El uso de una sonda de CNA para inmovilizar indirectamente el CNA puede proporcionar una valiosa alternativa a inmovilizar

directamente el CNA, en parte debido a que el uso del anterior método permite la elución de etapa final con métodos diferentes a aquellos empleados para el último.

En otro ejemplo aplicable al aislamiento y la purificación de nucliones ensamblados, se prepara una columna en la que un factor de elongación tal como EF-Tu o eEF1A se une a una matriz de fase sólida, según los métodos de Chinali (Chinali, 1977, J Biochem. Biophys. Methods, 34:1). Las moléculas de EF-Tu (o eEF1A) inmovilizadas sobre la matriz sólida se unen a las moléculas de ARNt en la cáscara de ribocápside del nuclión, y permiten la separación de nucliones de otros materiales. A condición de que moléculas de ARNt no unidas en nucliones sean primero eliminadas de la mezcla por métodos conocidos para aquellos expertos en la materia (por ejemplo, por filtración en gel Sephadex en una columna), las columnas EF-Tu (o eEF1A) pueden proporcionar un método útil de separación de nucliones que no están envueltos.

Dado que hay una alta concentración de ciertas proteínas de factor de elongación dentro de las células, tales como EF-Tu (en bacterias y orgánulos relacionados en eucariotas) y eEF1A (en el citoplasma de eucariotas), una fracción sustancial de los nucliones aislados de fuentes naturales puede estar envuelta por tales proteínas. Etapas especiales pueden incorporarse en los procedimientos cuando se aíslan nucliones de fuentes naturales para tratar estos nucliones con envuelta cuando están presentes. Los nucliones con envuelta de peso molecular más alto pueden separarse primero de los factores de elongación de peso molecular más bajo no unidos (por ejemplo, pero no se limitan a, por filtración en gel, centrifugación o precipitación). Esta fracción de peso molecular más alto puede entonces aplicarse a una columna que contiene un soporte de fase sólida con el que los anticuerpos monoclonales específicos para el factor de elongación aplicable (que incluyen, pero no se limitan a, EF-Tu o eEF1A) se han conjugado previamente. Se seleccionan condiciones que producen que los nucliones con envuelta se unan a los anticuerpos sobre la columna, y las impurezas se lavan de la columna. Aplicando entonces un cambio en las condiciones químicas, de pH, temperatura u otras condiciones de la columna, los nucliones con envuelta se desprenden de los anticuerpos monoclonales y se recogen de la columna.

En la purificación de nucliones, puede usarse electroforesis para separar nucliones y nucliones con envuelta de otros materiales. Varios ejemplos de tales usos de electroforesis se proporcionan en la sección titulada 'Fabricación de nucliones'. Tales metodologías electroforéticas pueden combinarse con otras técnicas, que incluyen, pero no se limitan a, gradientes de temperatura para mejorar el grado de separación de los nucliones de otros materiales.

Otra consideración importante para el ensamblaje de nucliones es la susceptibilidad de ARN a nucleasas. Cuando nucliones o nucliones con envuelta se aíslan de fuentes naturales, pueden procesarse con el fin de que las ribonucleasas se inactiven rápidamente, usando métodos familiares para los expertos en la biología molecular.

Pueden recogerse inmediatamente o rápidamente tras la alteración celular. Un inhibidor de ribonucleasas puede añadirse tras la recogida con el fin de inactivar las ribonucleasas. Cuando los nucliones se ensamblan sintéticamente a partir de materiales de partida naturales o no naturales, los materiales de partida pueden ser preparados sustancialmente libres de ribonucleasa o aquellas ribonucleasas restantes se han vuelto suficientemente inactivas. Soluciones y equipo usado para la fabricación y purificación de nucliones pueden estar sustancialmente libres de actividad de ribonucleasa.

Pueden aislarse nucliones naturales o nucliones con envuelta naturales de fuentes naturales, separarse de otros componentes celulares o separarse de otros nucliones, usando una o más metodologías de fraccionamiento indirecto.

Otra consideración cuando se aíslan nucliones o nucliones con envuelta de fuentes naturales es que la semivida del ARN mensajero usado para formar el ácido nucleico de núcleo puede ser relativamente corta. La semivida de los ARNm en bacterias y orgánulos eucariotas relacionados es, en promedio, sustancialmente incluso más corta que la semivida del ARNm en el citoplasma de eucariotas. Además, ARNm maduros en bacterias son frecuentemente policistrónicos, mientras que la mayoría de los ARNm eucariotas son monocistrónicos y pueden ser más cortos. El efecto neto de estas diferencias, en varias realizaciones, es que en condiciones predefinidas, los nucliones y los nucliones con envuelta aislados de fuentes eucariotas requieren tiempos de procesamiento diferentes de aquellos de fuentes bacterianas.

Puede haber un orden preferido de ensamblaje de ribocápsides para ciertos tipos de nuclión, que se sigue en el proceso de fabricación. Los nucliones de ARNt fabricados a partir de un ARN de núcleo y ARNt aminoacilados de ribocápside pueden ensamblarse a partir del ARNt cargado en el codón en el extremo 5' de la región de ribocápside en el CNA, luego la ribocápside se alarga progresivamente añadiendo ARNt cargados a la ribocápside en la dirección 5' a 3', de forma que el último ARNt cargado que va a añadirse está unido al codón en el extremo 3' de la región de ribocápside en el CNA. Alternativamente, una secuenciación tal de adición de ARNt puede no ser necesaria o puede no ser deseable. Tal adición de ARNt progresiva puede no ser práctica ni deseable si múltiples codones en un ácido nucleico de núcleo son específicos para la misma especie de ARNt. El nuclión puede ensamblarse automáticamente cuando se presenta con una mezcla apropiada de ácido nucleico de núcleo y ácidos nucleicos de ribocápside relacionados.

#### Relación molar y rendimiento de nucliones

Puede ser deseable cuando se fabrican nucliones lograr, mantener o superar sustancialmente una relación molar predeterminada de moléculas de ribocápside con respecto a moléculas de ácido nucleico de núcleo. Por ejemplo, cuando se fabrican nucliones de ARNt, puede desearse emplear cada ARNt en la formulación a una concentración de 10 - 15  $\mu\text{M}$  y el ácido nucleico de núcleo a una concentración de 0,05 - 0,3  $\mu\text{M}$ . Cuando se emplean tales condiciones y la relación molar de ARNt:CNA es 50:1, aproximadamente el 75 % del CNA puede convertirse en nucliones (es decir, el 'rendimiento de nucliones' es del 75 %). Cuando la relación molar se eleva a 200:1, este rendimiento de nucliones puede aumentar al 95 % o más. La relación molar requerida para lograr un rendimiento de nucliones dado puede variar, dependiendo de los ARNt específicos y CNA usados, la concentración de cationes monovalentes, divalentes y polivalentes presentes en el tampón, además del pH y la temperatura de la solución de reacción.

#### Preparaciones homogéneas y heterogéneas

El fabricante puede elegir producir o bien preparaciones homogéneas o bien heterogéneas de nucliones y ribocápsides, según el diseño y las especificaciones funcionales para una aplicación particular. La estabilidad de un ácido nucleico de núcleo ('CNA') puede aumentarse adecuadamente fabricando una preparación de nuclión heterogénea en la que varía la relación de moléculas de subunidad de ribocápside de ARNt ('tRSM') con respecto a moléculas de ácido nucleico de núcleo. Por ejemplo, un ácido nucleico de núcleo predefinido se mezcla con un conjunto predefinido de subunidades de ribocápside de ARNt bajo condiciones predefinidas, tras lo cual los nucliones ensamblados tienen todos el mismo ácido nucleico de núcleo, pero la relación tRSM/CNA varía de 4 a 6. Entonces, los nucliones en las tres categorías de nuclión (relaciones tRSM/CNA de 4, 5 y 6) se recogen, se purifican y se usan como una preparación heterogénea para el fin previsto.

Puede desearse separar nucliones con una relación RSM/CNA particular de nucliones con diferentes relaciones RSM/CNA. Por ejemplo, un ácido nucleico de núcleo predefinido se mezcla con un conjunto predefinido de subunidades de ribocápside de ARNt en condiciones predefinidas, tras lo cual los nucliones ensamblados tienen todos el mismo ácido nucleico de núcleo pero la relación tRSM/CNA varía de 4 a 6. Entonces, los nucliones con una relación tRSM/CNA de 5 se recogen, se purifican y se usan como una preparación homogénea para el fin previsto.

Métodos para la separación y purificación adicional de nucliones se describen en cualquier parte en el presente documento, estos métodos pueden aplicarse a preparaciones heterogéneas y homogéneas de nucliones. Ejemplos de métodos aplicables a la separación de nucliones incluyen, pero no se limitan a, electroforesis preparativa en gel, filtración en gel, cromatografía líquida de proteínas rápida y ultracentrifugación a un gradiente de densidad de sacarosa. La electroforesis en gel puede ser un método de separación de nucliones preferido. Este método de separación de nucliones puede implementarse aplicando una preparación de nucliones heterogénea a un gel de poliacrilamida al 12 % no desnaturizante de 7,5 - 15 cm de largo en tampón Tris-borato 90 mM a pH 8,3 con  $\text{MgCl}_2$  5 mM. Dependiendo de la anchura y el espesor del gel (0,15 - 2,0 mm), pueden aplicarse al gel preparaciones de nucliones que oscilan de algunos  $\mu\text{l}$  a algunos ml. Antes de cargar sobre el gel, la reacción se mezcla con 0,1 volúmenes de solución densificante tal como 20 % de glicerol, 0,25 % de azul de bromofenol, 0,25 % de xilencianol. La electroforesis se lleva entonces a cabo a temperatura ambiente o en una sala fría hasta que el indicador de azul de bromofenol llegue a la parte inferior del gel. Si el CNA está radiomarcado, los nucliones resueltos (que varían en relación tRSM/CNA) se visualizan por autorradiografía o detección y cuantificación de la radiactividad, de otro modo se usa ensombrecimiento UV. Cada banda de interés se suprime del gel y el nuclión se recupera por electroelución o extracción simple en el tampón de elección. Dependiendo de la naturaleza de los nucliones preparados, el porcentaje de acrilamida en el gel y la composición del tampón de electroforesis, varía el tiempo de electroforesis (como se determina por el tiempo al que el indicador llega a la parte inferior del gel).

#### Cationes divalentes y concentración de magnesio

Puede ser deseable cuando se fabrican nucliones lograr, mantener o superar sustancialmente una concentración predeterminada de uno o más cationes divalentes. El catión divalente puede ser preferentemente un ión magnesio. Aunque la formación de nucliones puede tener lugar en ausencia de cationes divalentes, la presencia de ión magnesio puede potenciar el rendimiento. Con respecto al ensamblaje de nucliones realizado en ausencia de cationes divalentes, el rendimiento de nucliones en varias realizaciones aumenta el 40 % en presencia de  $\text{MgCl}_2$  10 mM y el 60 % en presencia de  $\text{MgCl}_2$  80 mM, que es próximo a la saturación en aquellas condiciones. Así, cuando se fabrican nucliones de ARNt, puede desearse mantener una concentración de  $\text{MgCl}_2$  de 40-80 mM.

#### Temperatura

Puede ser deseable cuando se fabrican nucliones mantener o superar sustancialmente una temperatura predeterminada. Por ejemplo, cuando se llevan a cabo reacciones idénticas a 37 °C y en un baño de hielo, tanto la tasa como el grado de reacción pueden ser mayores a la temperatura más alta. Por tanto, cuando se fabrican nucliones de ARNt, puede ser deseable realizar la reacción a una temperatura predefinida de 25 - 37 °C. Puede desearse mantener una temperatura de fabricación inferior a una temperatura predefinida.

## Reticulación y psoralenos

Puede ser deseable cuando se fabrican nucliones aumentar la estabilidad de los nucliones ensamblados. Esto puede llevarse a cabo por reticulación de uno o más componentes de nuclión. Puede emplearse un reticulante predeterminado para introducir un enlace covalente entre dos bases en hebras separadas de ARN. Las hebras pueden ser de bases apareadas o simplemente estar en estrecha proximidad. El agente de reticulación puede ser eficiente, rápido y reversible, pero no destructivo para la estructura de nuclión global. Por ejemplo, las mostazas nitrogenadas bifuncionales son reticulantes ineficaces e introducen enlaces no reversibles mientras que el cis-diaminodicloroplatino, que reacciona con G adyacentes en la misma hebra, no introduce reticulaciones entre las hebras. El formaldehído, aunque es un excelente reticulante bifuncional, reacciona con determinantes de Watson-Crick y desnaturaliza cierto ADN y ARN bicatenario. A diferencia, los psoralenos representan agentes de reticulación fotoquímicos preferidos para la estabilización de la estructura del nuclión. Estos compuestos se intercalan en ácido nucleico bicatenario, que incluye dúplex de ARN-ARN, y en presencia de luz ultravioleta cercana forman un enlace covalente entre las dos uridinas en una secuencia A-U o U-A bicatenaria. La fotorreticulación puede ser rápida y eficiente y la reticulación resultante puede ser convenientemente foto-invertida por exposición a luz de 260 nm. Por ejemplo, en varias realizaciones, en tanto que uno o más de los ARNt que son parte de un nuclión tengan un anticodón que lleva A-U o U-A, los anticodones en las subunidades de ribocápside y los codones en el ácido nucleico de codón pueden ser fotorreticulados por psoraleno. Psoralenos representativos, en varias realizaciones, incluyen 4,5',8-trimetilpsoraleno, 8-metoxipsoraleno y 4-aminometil-4,5',8-trimetilpsoraleno. Pueden emplearse diferentes métodos para la reticulación predeterminada de componentes de nuclión. La reticulación puede ser deseable para aumentar la semivida de un componente de ácido nucleico activo que se formula como el ácido nucleico de núcleo en complejos de nuclión. Alternativamente, puede no ser necesaria la reticulación.

## Ejemplo 11: Fabricación de un nuclión básico

Se fabrica un nuclión de ARNt compuesto de subunidades de ribocápside de Met-ARNtMet del siguiente modo: se incuban Met-ARNtMet 15  $\mu\text{M}$  y ARNm de núcleo 0,15  $\mu\text{M}$  (con 9 codones AUG consecutivos; 5'--GGG-AUG-AUG-AUG-AUG-AUG-AUG-AUG-AUG-CUU-UCU-AGG-CAC-ACG-AGA--3' SEQ ID NO: 3) 10 min a 37 °C en 2 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  80 mM ('tampón de reacción X1'). El producto fabricado por este método es un ejemplo de un nuclión básico.

Con el fin de purificar este nuclión básico, es ventajoso añadir un grupo destiobiotina al CNA de manera que los nucliones puedan purificarse del exceso de ARNt. Si el ARNm se sintetiza químicamente, un grupo destiobiotina puede conjugarse directamente con el extremo 3' del ARN en el momento de la síntesis. De otro modo, si el ARNm se prepara por transcripción, puede hibridarse con un oligonucleótido de ADN complementario que él mismo está unido a destiobiotina (por ejemplo, 5'--destiobiotina-TCTCGTGTGCCTAGAAAAG--3': SEQ ID NO: 4). El extremo 5' del ARNm puede ser opcionalmente radiomarcado con  $^{32}\text{P}$  antes de uso mediante tratamiento con fosfatasa alcalina de gamba, si se necesitara, y luego cinasa de T4 polinucleótido en presencia de  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP.

La purificación por afinidad de los nucliones se aprovecha de la afinidad diferencial de la estreptavidina por la biotina con respecto a la destiobiotina. Tras la formación de nucliones, la solución de reacción se mezcla con estreptavidina-Sepharose (GE Healthcare) de la copa de arriba de varios cartuchos de filtración Ultrafree-MC (Milipore). Después de la incubación durante 10 min, los cartuchos se centrifugan 10 s a 10.000 rpm para eliminar la solución acuosa. Entonces se lava Sepharose dos veces para eliminar cualquier ARNt libre. El CNA y los nucliones asociados se desplazan de estreptavidina-Sepharose mediante la adición de biotina libre, que tiene una mayor afinidad por la estreptavidina que la destiobiotina. Obsérvese que todas las etapas de purificación se llevan a cabo en el tampón de reacción X1 a 5 -10 °C.

Si el análisis electroforético demuestra heterogeneidad en la preparación de nuclión, normalmente pueden resolverse multímeros individuales por cromatografía de filtración en gel. Puede ser ventajoso estabilizar covalentemente las subunidades de ribocápside fotorreticulando químicamente el triplete codón-anticodón por exposición a luz ultravioleta cercana en presencia de 4-aminometil-4,5',8-trimetilpsoraleno.

## Ejemplo 12: Fabricación de un nuclión de iniciación

Se fabrica un nuclión de ARNt de iniciación con una secuencia de ribocápside mixta incubando 15  $\mu\text{M}$  de cada uno de fMet-ARNtMet, Phe-ARNtPhe y Cys-ARNtCys con 0,15  $\mu\text{M}$  de un CNA que codifica fMet-(Phe)<sub>3</sub>-Cys-Phe-Cys y contiene una secuencia de Shine-Dalgarno en la dirección 5' (5'--GGGAAGGAGGUAAAA-AUG-UUU-UUU-UUU-UGC-UUU-UGC-UAG-GCA--3'; SEQ ID NO: 5). Las reacciones se incuban 10 min a 37 °C en 2 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  80 mM. La purificación del nuclión de iniciación resultante es como se describe en el Ejemplo 11. El producto fabricado por este método es un ejemplo de un nuclión de iniciación.

## Ejemplo 13: Aislamiento de un nuclión natural

Se aísla un nuclión natural de ARNt de un extracto libre de células humanas capaz de catalizar la traducción *in vitro*. Tales extractos deben contener cantidades suficientes de ARNt cargados para soportar la formación de ribocápside

en un ARNm exógenamente añadido y están comercialmente disponibles de tanto Pierce como Avidity. Se añade un transcrito *in vitro* que codifica  $\beta$ -actina o una porción de la misma a un extracto tal. Antes de uso, el ARNm se radiomarca y/o se hibrida con un oligonucleótido de ADN complementario que lleva destiobiotina, facilitándose así la detección y purificación por afinidad. Si el ARNm se radiomarca puede ser directamente analizado para la formación de nucliones por métodos electroforéticos o cromatográficos convencionales. Alternativamente, si el ARNm tiene una marca de afinidad de destiobiotina, puede purificarse usando estreptavidina-Sepharose como se describe en el Ejemplo 11.

La adición de ARNm de  $\beta$ -actina no modificada puede proporcionar una prueba de si los nucliones en ARNm endógenos pueden aislarse o no y caracterizarse a partir de células humanas recién lisadas. El ARNm de  $\beta$ -actina puede añadirse junto con un oligonucleótido de ADN conjugado con destiobiotina que es complementario a una región en la que el ARNm está situado 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante. Durante la incubación, tanto la formación de nucliones como la hibridación pueden tener lugar de manera que el ARNm resultante pueda ser aislado por afinidad. La detección del ARNm se facilita tras el análisis electroforético o cromatográfico, por ejemplo, incluyendo una radiomarca en la sonda de captura de ADN o por hibridación Northern. Finalmente, antes de aislar el ARNm de  $\beta$ -actina, la estructura de nuclión se fija por fotorreticulación con psoraleno para estabilidad añadida. La secuencia de ARNm para  $\beta$ -actina humana, que incluye regiones no traducidas 3' y 5', se describe en Ponte et al. (Ponte et al., 1984, Nucleic Acids Research 12: 1687).

El producto obtenido de este proceso es un ejemplo de un nuclión aislado.

Donde se den intervalos, están incluidos los puntos finales. Además, debe entenderse que a menos que se indique lo contrario o sea de otro modo evidente a partir del contexto y entendimiento de un experto habitual en la materia, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor específico o subintervalo dentro de los intervalos establecidos en diferentes realizaciones de la invención, al décimo de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo.

Además, debe entenderse que cualquier realización particular de la presente invención que entra dentro del estado de la técnica puede ser explícitamente excluida de una cualquiera o más de las reivindicaciones. Como se considera que tales realizaciones son conocidas para un experto habitual en la materia, pueden excluirse, aunque la exclusión no se expone explícitamente en el presente documento. Cualquier realización particular de las composiciones de la invención (por ejemplo, cualquier composición de nuclión, cualquier composición de ribocápside, cualquier componente de nuclión, cualquier modificación, cualquier método de preparación de nucliones, ribocápsides o un componente de nuclión, cualquier aplicación de nucliones, ribocápsides o componentes de nuclión, etc.) puede excluirse de una cualquiera o más reivindicaciones, por cualquier motivo, tanto si está relacionado como si no con la existencia del estado de la técnica.

Las publicaciones tratadas anteriormente y en todo el texto se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tengan derecho a anteceder tal divulgación en virtud de la divulgación previa.

#### Listado de secuencias

<110> Webb, Nigel Gamper, Howard

<120> Nucliones y ribocápsides

<130> 018065-5001

<150> 61/411.974

<151> 10-11-2010

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 42

<212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> ARNmMet

<400> 1

gggaugauga ugaugaugau gaugaugaug cuuucuaggc ac 42



# ES 2 639 420 T3

5  
<210> 2  
<211> 42  
<212> ARN  
<213> artificial

10  
<220>  
<223> ARNm  
<400> 2  
gggaaggagg uaaaaauguu uuuuuuuugc uuuugcuagg ca 42

15  
<210> 3  
<211> 48  
<212> ARN  
<213> artificial

20  
<220>  
<223> ARNm  
<400> 3  
gggaugauga ugaugaugau gaugaugaug cuuucuaggc acacgaga 48

25  
<210> 4  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> artificial

30  
<220>  
<223> un oligonucleótido de ADN complementario unido a destiobiotina  
<400> 4  
tctcgtgtgc ctagaaag 18

35  
<210> 5  
<211> 42  
<212> ARN  
<213> artificial

40  
<220>  
<223> ARN que contiene secuencia de Shine-Dalgarno  
<400> 5  
gggaaggagg uaaaaauguu uuuuuuuugc uuuugcuagg ca 42

## REIVINDICACIONES

1. Un nuclión aislado que comprende (i) un ácido nucleico de núcleo, y (ii) una o más ribocápsides que comprenden cada una un polímero de dos o más subunidades de ribocápside, en el que
- 5 (a) el ácido nucleico de núcleo comprende, como una porción o totalidad de su estructura, una región con sitios de unión múltiples con los que se unen a subunidades de ribocápside;
- (b) las subunidades de ribocápside comprenden cada una un ácido nucleico y al menos un sitio de unión con el que se unen a un sitio de unión en el ácido nucleico de núcleo; y
- 10 (c) la mayoría o la totalidad de las subunidades de ribocápside comprenden al menos un sitio de unión con el que se unen a un sitio de unión en una subunidad de ribocápside adyacente unida al mismo ácido nucleico de núcleo.
2. El nuclión aislado de la reivindicación 1, en el que (a) la mayoría o la totalidad de las subunidades de ribocápside están unidas a al menos una parte del ácido nucleico de núcleo, y (b) la mayoría o la totalidad de las subunidades de ribocápside están unidas a al menos una parte de una o más subunidades de ribocápside adyacentes.
3. El nuclión aislado de la reivindicación 1, en el que dicho nuclión comprende además una o más envueltas de nuclión, en el que cada envuelta de nuclión es una composición que comprende (i) una envuelta, cáscara, cierre, capa, película, superficie, envoltura, recubrimiento, camisa, protección, revestimiento, cubierta, tratamiento, encapsulación, una combinación de cualesquiera dos o más de los anteriores, o un híbrido de cualesquiera dos o más de los anteriores, y (ii) un medio de unión de dicha composición a la totalidad, una parte o partes de un nuclión sin una envuelta de nuclión.
- 20 4. El nuclión aislado de la reivindicación 3, en el que al menos una de las envueltas de nuclión está unida a al menos una parte de (a) la parte de nuclión básico del nuclión, (b) un ácido nucleico de núcleo, (c) una o más de las ribocápsides, (d) una o más de las subunidades de ribocápside, (e) otra envuelta de nuclión del nuclión, o (f) cualquier combinación de los anteriores.
- 25 5. El nuclión aislado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que una o más de las subunidades de ribocápside comprenden ARN que incluye ARN de transferencia.
- 30 6. El nuclión aislado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que una o más de las subunidades de ribocápside comprenden ARN de transferencia iniciador y una o más de las subunidades de ribocápside comprenden ARN de transferencia elongador.
- 35 7. El nuclión aislado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico de núcleo comprende ADN, ARN o ARNm.
- 40 8. El nuclión aislado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico de núcleo comprende ARNm, y una o más de las subunidades de ribocápside están unidas a dicho ARNm: en o cerca de un codón de iniciación, una secuencia de marcador de síntesis de proteínas en dicho ARNm, o una secuencia de Shine-Dalgarno o de Kozak en dicho ARNm.
- 45 9. El nuclión aislado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico de núcleo comprende ARNm, y uno o más componentes de nuclión del nuclión se unen además a al menos una parte de un ribosoma y/o dicho ARNm está unido a al menos una parte de un ribosoma.
- 50 10. El nuclión aislado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho nuclión aislado es un nuclión de iniciación, en el que (i) el ácido nucleico de núcleo comprende ARNm y (ii) al menos una parte de dicho ARNm comprende una ribocápside y/o secuencia de unión de subunidad de ribocápside operativamente unida al codón de iniciación en dicho ARNm.
- 55 11. Un método para la fabricación del nuclión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes poniendo en asociación entre sí dos o más componentes de nuclión en el que tal combinación está seleccionada del grupo que consiste en (i) un ácido nucleico de núcleo y dos o más subunidades de ribocápside, (ii) un ácido nucleico de núcleo, dos o más subunidades de ribocápside, y una o más envueltas de nuclión predefinidas, (iii) un nuclión básico y una o más envueltas de nuclión predefinidas, (iv) un ácido nucleico de núcleo y dos o más subunidades de ribocápside de ARNt, (v) un ácido nucleico de núcleo, dos o más subunidades de ribocápside de ARNt, y una o más envueltas de nuclión predefinidas, (vi) un nuclión de ARNt básico y una o más envueltas de nuclión predefinidas, (vii) un nuclión con envuelta y una o más envueltas de nuclión predefinidas, (viii) una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo, y (ix) un híbrido de dos o más miembros de este grupo.
- 60 12. El método de la reivindicación 11, en el que el método está seleccionado del grupo que consiste en (1) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside, (2) añadir una o más preparaciones de ácido nucleico de núcleo a una preparación de subunidad de ribocápside, (3) añadir
- 65

una o más preparaciones de subunidad de ribocápside a una preparación de ácido nucleico de núcleo, (4) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo inmovilizada directamente o indirectamente sobre una fase sólida con una o más preparaciones de subunidades de ribocápside que no están inmovilizadas, (5) combinar una o más preparaciones de subunidad de ribocápside inmovilizadas directamente o indirectamente sobre una fase sólida con una preparación de ácido nucleico de núcleo que no está inmovilizada, (6) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo inmovilizada directamente o indirectamente sobre una fase sólida con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside inmovilizadas directamente o indirectamente sobre una fase sólida, (7) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside usando un proceso discontinuo, (8) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside usando un proceso continuo, (9) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside, luego mezclar la combinación, (10) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside, luego separar los nucleones resultantes del ácido nucleico de núcleo no en nucleones, (11) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside, luego separar los nucleones resultantes de las subunidades de ribocápside no en nucleones, (12) combinar una preparación de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de subunidad de ribocápside, luego separar los nucleones resultantes de tanto el ácido nucleico de núcleo no en nucleones como las subunidades de ribocápside no en nucleones, (13) combinar una preparación de nucleón básico con una o más preparaciones de envuelta de nucleón, (14) añadir una o más preparaciones de nucleón básico a una preparación de envuelta de nucleón, (15) añadir una o más preparaciones de envuelta de nucleón básico a una preparación de nucleón, (16) combinar una preparación que contiene nucleones básicos inmovilizados directamente o indirectamente sobre una fase sólida con una o más preparaciones que contienen envueltas de nucleón que no están inmovilizadas, (17) combinar una o más preparaciones que contienen envueltas de nucleón inmovilizadas directamente o indirectamente sobre una fase sólida con una preparación que contiene nucleones básicos que no están inmovilizados, (18) combinar una o más preparaciones que contienen nucleones básicos inmovilizados directamente o indirectamente sobre una fase sólida con una o más preparaciones que contienen envueltas de nucleón inmovilizadas directamente o indirectamente sobre una fase sólida, (19) combinar una o más preparaciones de nucleón básico con una o más preparaciones de envuelta de nucleón usando un proceso discontinuo, (20) combinar una o más preparaciones de nucleón básico con una o más preparaciones de envuelta de nucleón usando un proceso continuo, (21) combinar una o más preparaciones de nucleón básico con una o más preparaciones de envuelta de nucleón, luego mezclar la combinación, (22) combinar una o más preparaciones de nucleón básico con una o más preparaciones de envuelta de nucleón, luego separar los nucleones con envuelta resultantes de los nucleones no en nucleones con envuelta, (23) combinar una o más preparaciones de nucleón básico con una o más preparaciones de envuelta de nucleón, luego separar los nucleones con envuelta resultantes de las envueltas de nucleón no en nucleones con envuelta, (24) combinar una o más preparaciones de nucleón básico con una o más preparaciones de envuelta de nucleón, luego separar los nucleones con envuelta resultantes de tanto los nucleones básicos no en nucleones con envuelta como las envueltas de nucleón no en nucleones con envuelta, (25) combinar una o más preparaciones de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de unidad de ribocápside y una o más preparaciones de envuelta de nucleón, (26) combinar una o más preparaciones de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de unidad de ribocápside y una o más preparaciones de envuelta de nucleón, luego mezclar la combinación, (27) combinar una o más preparaciones de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de unidad de ribocápside y una o más preparaciones de envuelta de nucleón, luego separar los nucleones con envuelta resultantes de la combinación resultante, (28) combinar una o más preparaciones de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de unidad de ribocápside y una o más preparaciones de envuelta de nucleón en un proceso discontinuo, (29) combinar una o más preparaciones de ácido nucleico de núcleo con una o más preparaciones de unidad de ribocápside y una o más preparaciones de envuelta de nucleón en un proceso continuo, (30) una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo, y (31) un híbrido de cualesquiera dos o más miembros de este grupo.

13. El método de la reivindicación 11, en el que el método comprende además una o más etapas seleccionadas del grupo que consiste en (1) emplear una relación molar de subunidades de ribocápside con respecto a ácido nucleico de núcleo de más de aproximadamente 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000; (2) que incluye cloruro de magnesio, iones magnesio, o sales de magnesio a una concentración en solución de más de aproximadamente 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 milimoles por litro; (3) omitir poliaminas de todas las soluciones y preparaciones; (4) asegurar que todas las soluciones y preparaciones estén libres de nucleasas; (5) asegurar que todas las soluciones, equipo, soportes, consumibles, suministros y otros artículos que se ponen en contacto con los reactantes o producto estén sustancialmente libres de ribonucleasas; (6) emplear uno o más inhibidores de ribonucleasa que no interfieren con el ensamblaje de nucleones o la integridad de productos; (7) dejar tiempo suficiente para el ensamblaje en el que dicho tiempo supera 0,1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180, 240 o 300 segundos, (8) emplear un entorno de ensamblaje no desnaturizante, (9) realizar actividades de ensamblaje a una temperatura inferior a aproximadamente 0, 4, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55 o 60 grados Celsius; (10) reticular químicamente uno o más componentes de nucleón; (11) cualquier combinación de dos o más de los miembros de este grupo, y (12) cualquier híbrido de dos o más miembros de este grupo.

14. El método de la reivindicación 11, en el que el método comprende además aislar el nucleón por una o más etapas seleccionadas del grupo que consiste en separación basada en tamaño, separación basada en forma, separación

- 5 basada en masa, separación basada en afinidad química, separación basada en propiedades inmunológicas, separación usando un resto de biotina unido a un componente de nuclión, separación usando una sonda de ácido nucleico unida a un componente de nuclión, separación basada en propiedades eléctricas, separación basada en propiedades osmóticas, separación basada en propiedades magnéticas, separación basada en solubilidad, separación basada en electroforesis en un gel no desnaturizante, fraccionamiento de bandas tras la separación en un gel no desnaturizante, filtración, diálisis, cromatografía de exclusión en gel, cromatografía de intercambio iónico, y una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo.
- 10 15. El método de la reivindicación 11, en el que el método comprende además estabilizar el nuclión, durante o tras la fabricación, por una o más etapas seleccionadas del grupo que consiste en modificación química, modificación física, reticulación, reticulación de un componente de nuclión, reticulación de dos o más componentes de nuclión, introducción de un enlace covalente entre dos o más bases en hebras separadas de ácido nucleico, exposición a una mostaza nitrogenada bifuncional, exposición a cis-diaminodicloroplatino, exposición a formaldehído, exposición a un psoraleno, exposición a 4,5',8-trimetilpsoraleno, exposición a 8-metoxipsoraleno, exposición a 4-aminometil-
- 15 4,5',8-trimetilpsoraleno, liofilización, congelación, secado, refrigeración, adición de un inactivador, adición de un antioxidante, adición de un secuestrante, adición de un emulsionante, adición de un excipiente, adición de un tensioactivo, adición de un estabilizador de ultravioleta, adición de un inhibidor de ribonucleasas, y una combinación de cualesquiera dos o más miembros de este grupo.

Fig. 1

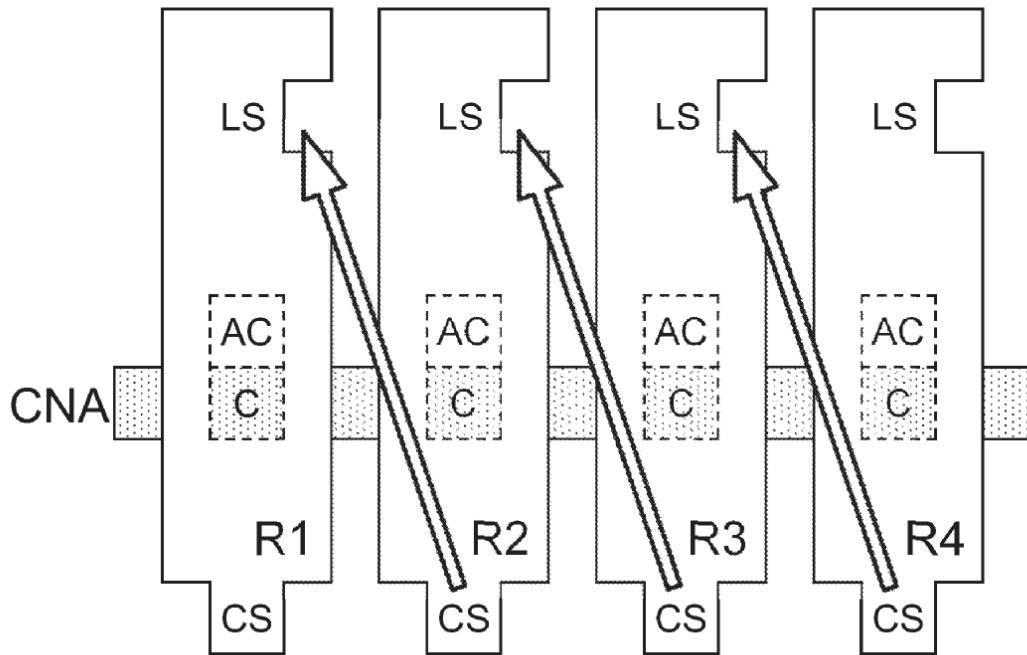


Fig. 2

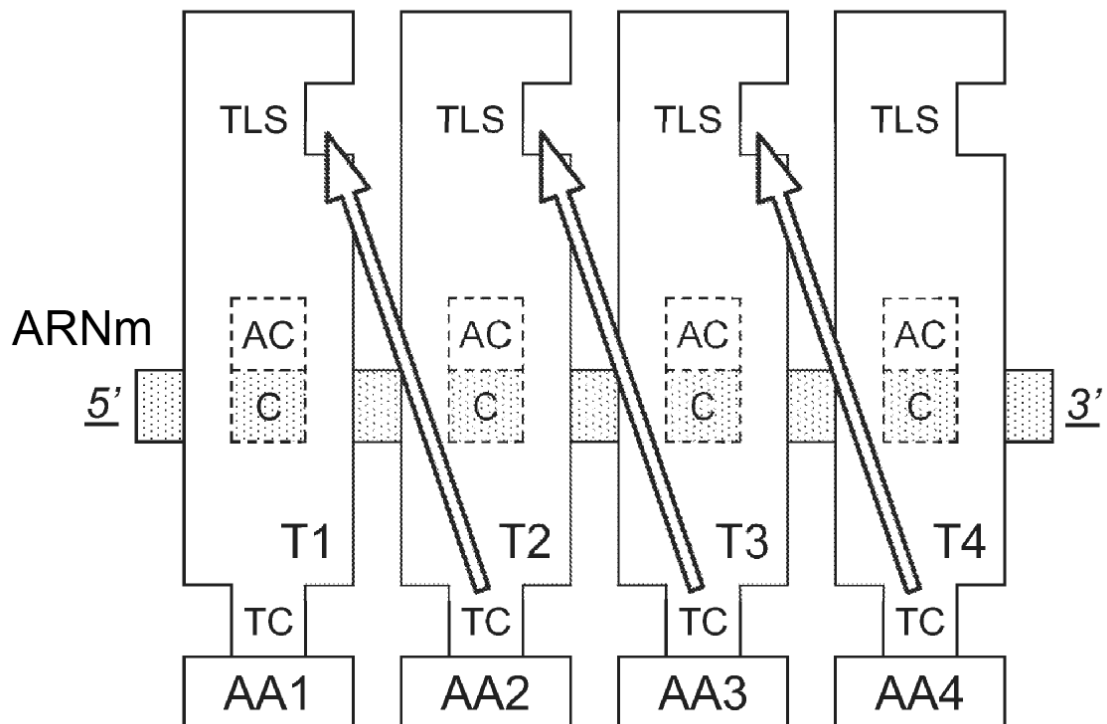


Fig. 3A

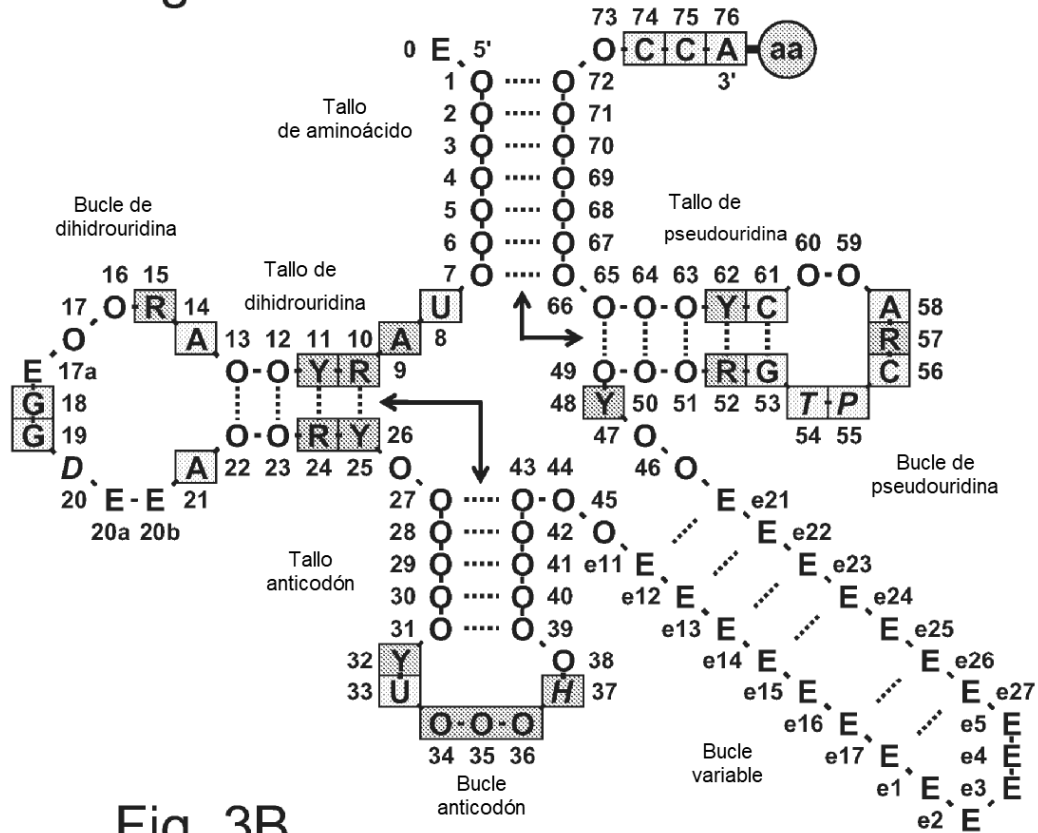


Fig. 3B

Prevalencia de secuencias (SP)	Nucleósidos	Purina / pirimidina
SP de nucleósidos* > 90 %	<b>G</b> Guanosina*	<b>R</b> Purina
<b>N</b> Nucleósido* con la SP más alta	<b>A</b> Adenosina*	<b>Y</b> Pirimidina
<b>N</b> Nucleósido modificado SP > 50 %	<b>C</b> Citidina *	
Purina o pirimidina SP > 90 %	<b>U</b> Uridina*	
Localización de nucleótido ocupado	<b>P</b> Pseudouridina	<b>ARNt analizados</b>
Localización de nucleótido anticodón	<b>T</b> Ribosiltimina	623 secuencias
<b>E</b> Localización de nucleótido extra	<b>H</b> Adenosina modificada	Todos los dominios
Sitio de unión de aminoácido	<b>D</b> Dihidrouridina	Todas las clases
	* y modificaciones	Todas las especificidades

Fig. 4A

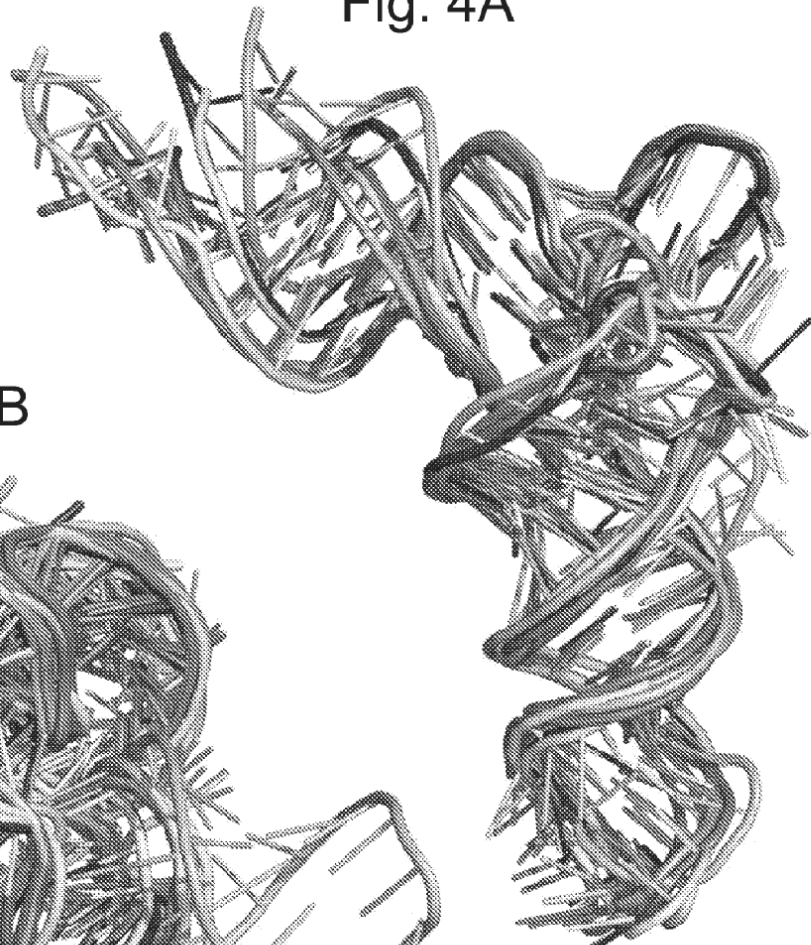


Fig. 4B

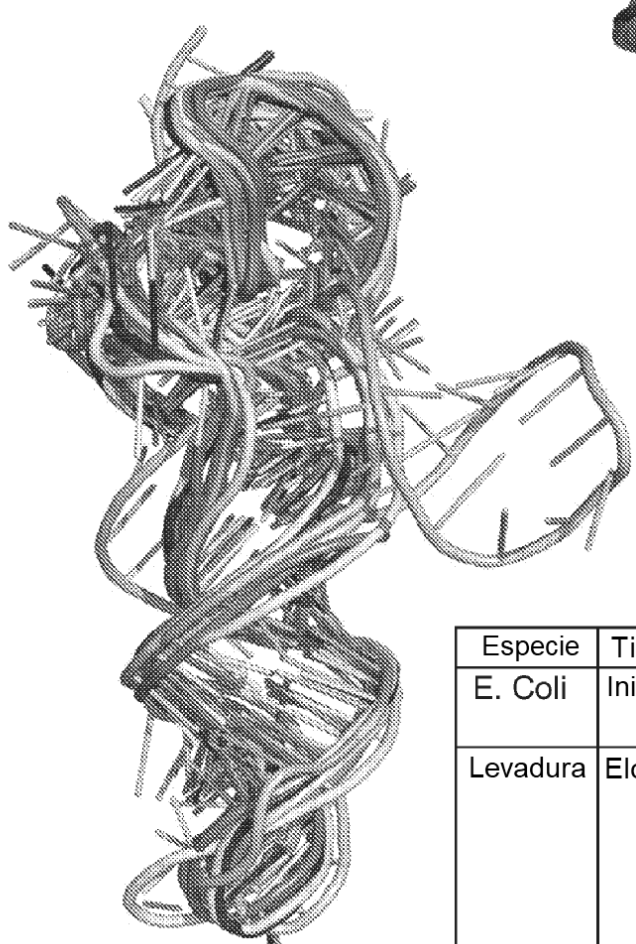


Fig. 4C

Especie	Tipo	AA	PDB	C
E. Coli	Iniciador	Met	3CW5	
			3CW6	
Levadura	Elongador	Phe	1EHZ	
			1EVV	
			2WDK	
			Asp	2TRA
	3TRA			
	Iniciador	Met	1YFG	
Ternero	Elongador	Lys	1FIR	
Humana	Elongador	Sec	3A3A	

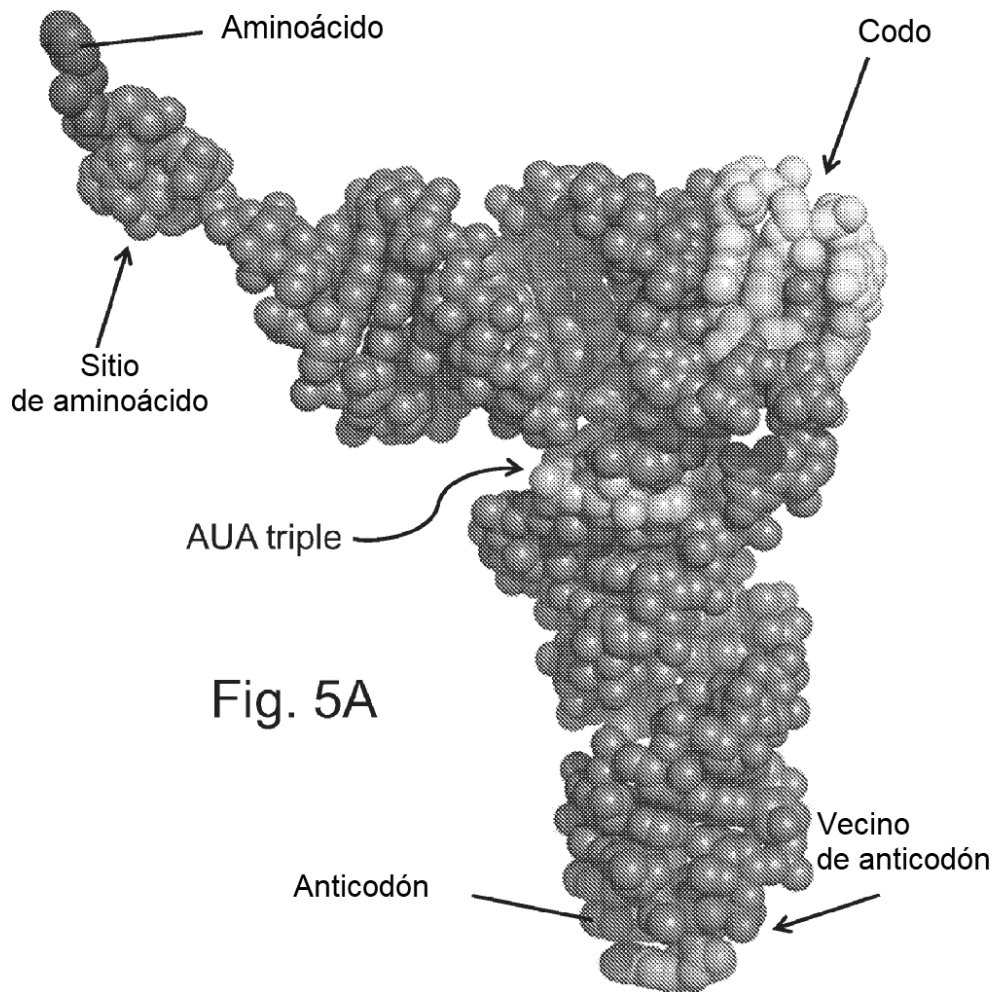


Fig. 5A

Fig. 5B

Vecino de anticodón	U33	15 nucleótidos GSP90
Sitio de aminoácido	C74 C75 A76	
Codo:	Bucle-P	G53 T54 P55 C56 C61 A58
	Bucle-D	G18 G19
AUA triple	A14 U8 A21	
Aminoácido	Anticodón	Otro



Capa	Nucleótidos GSP90 y purina conservada	Tipo de par de bases
L1	G56 = G19	Watson-Crick
L2	R57 (purina)	Ninguna
L3	P55 = G18	Otra
L4	T54 = A58	Otra
L5	G53 = C61	Watson-Crick

Fig. 6B

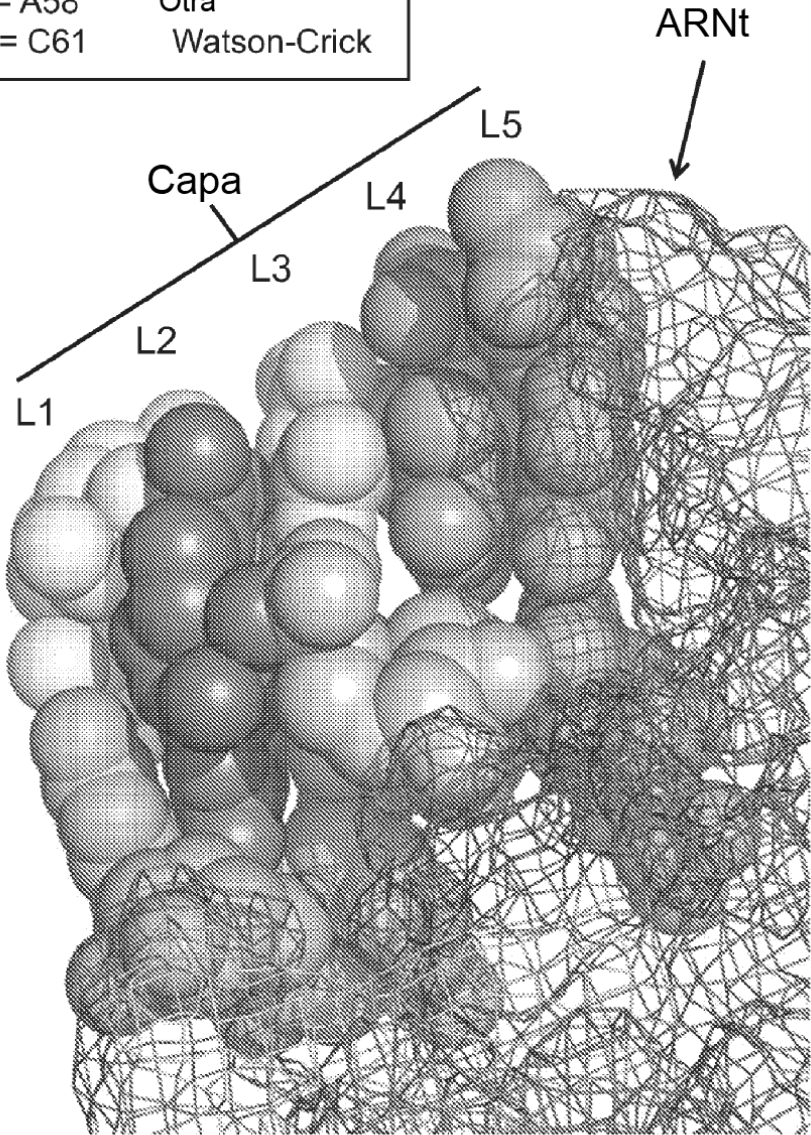


Fig. 6A

Fig. 6C

Capa	L1	L2	L3	L4	L5
ARNt	C56		P55	T54	G53
	G19	R57	G18	A58	C61

Clave de nucleótidos

Fig. 7A

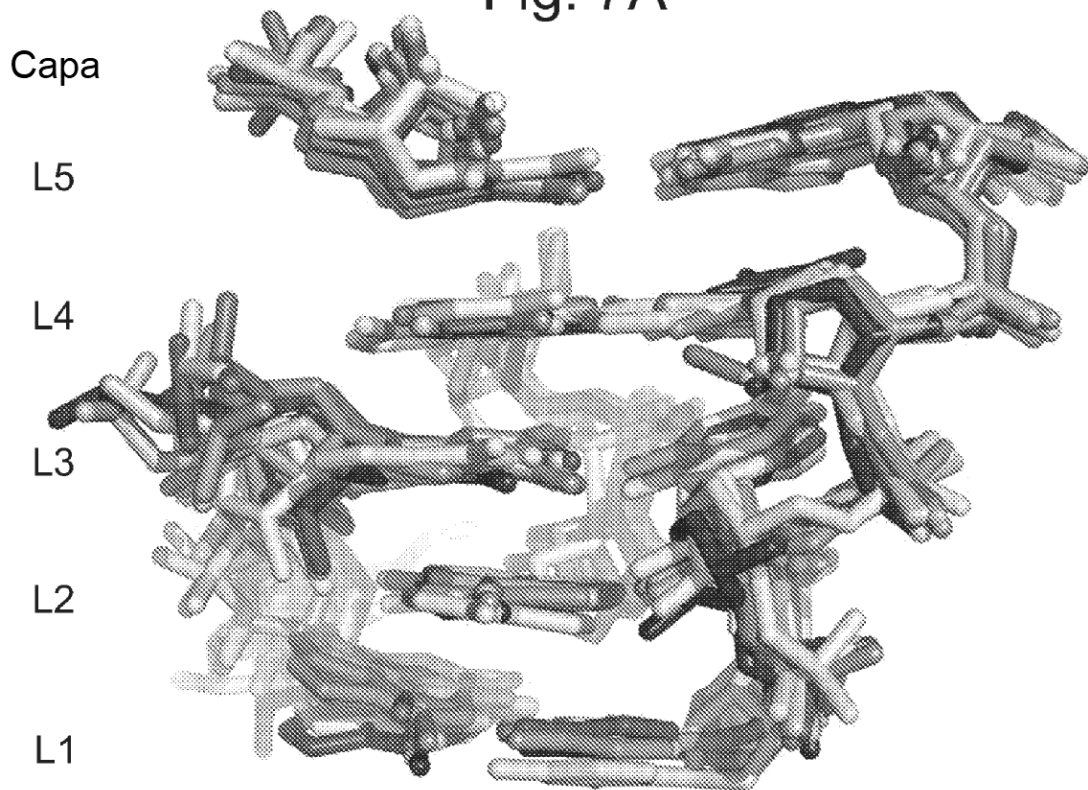


Fig. 7B

Especie	Tipo	AA	PDB	C
E. Coli	Iniciador	Met	3CW5	■
			3CW6	■
Levadura	Elongador	Phe	1EHZ	■
			1EUV	■
			2WDK	■
	Asp	2TRA	■	
3TRA		■		
	Iniciador	Met	1YFG	■
Ternero	Elongador	Lys	1FIR	■
Humana	Elongador	Sec	3A3A	■

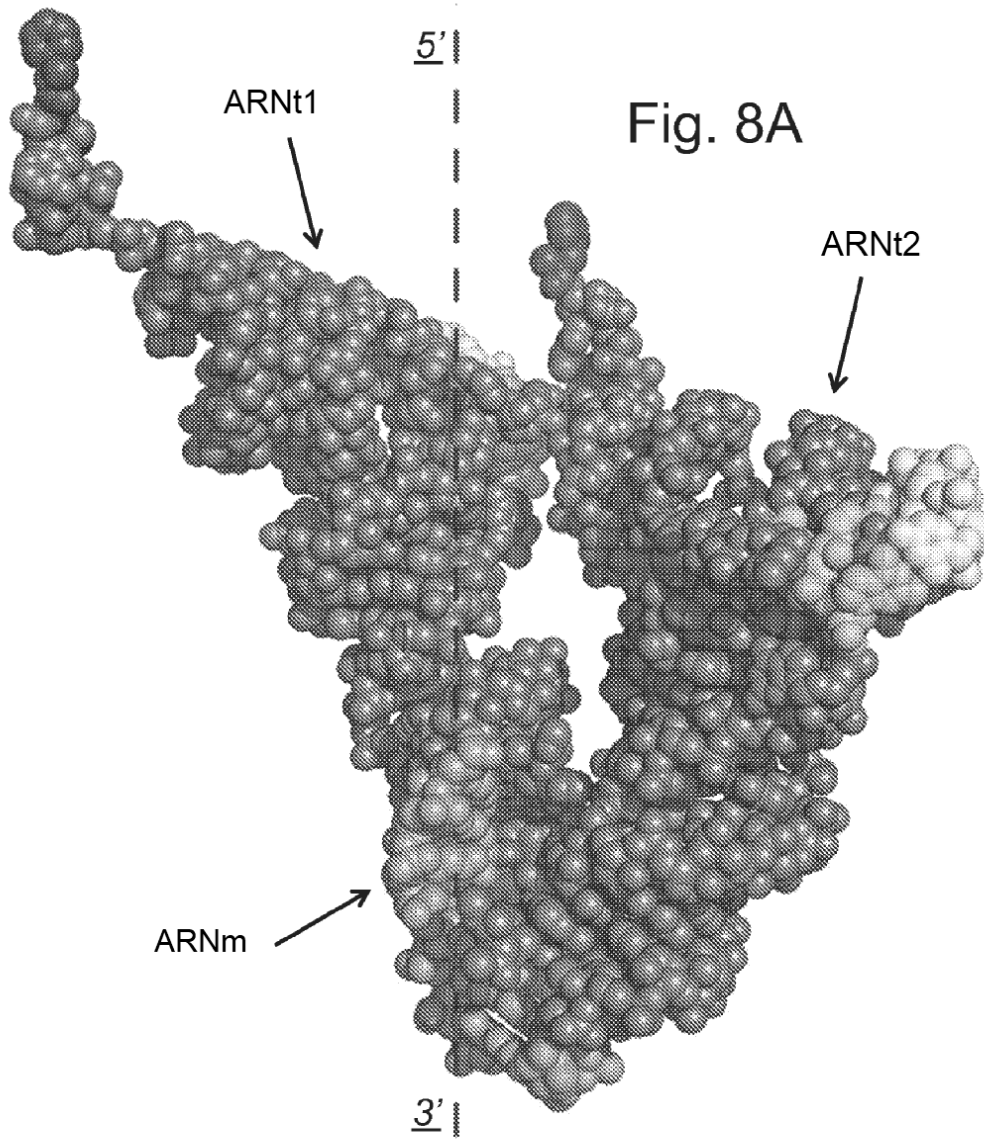
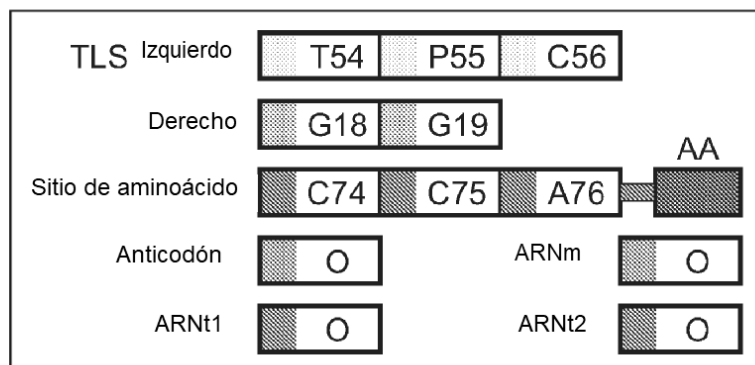


Fig. 8B



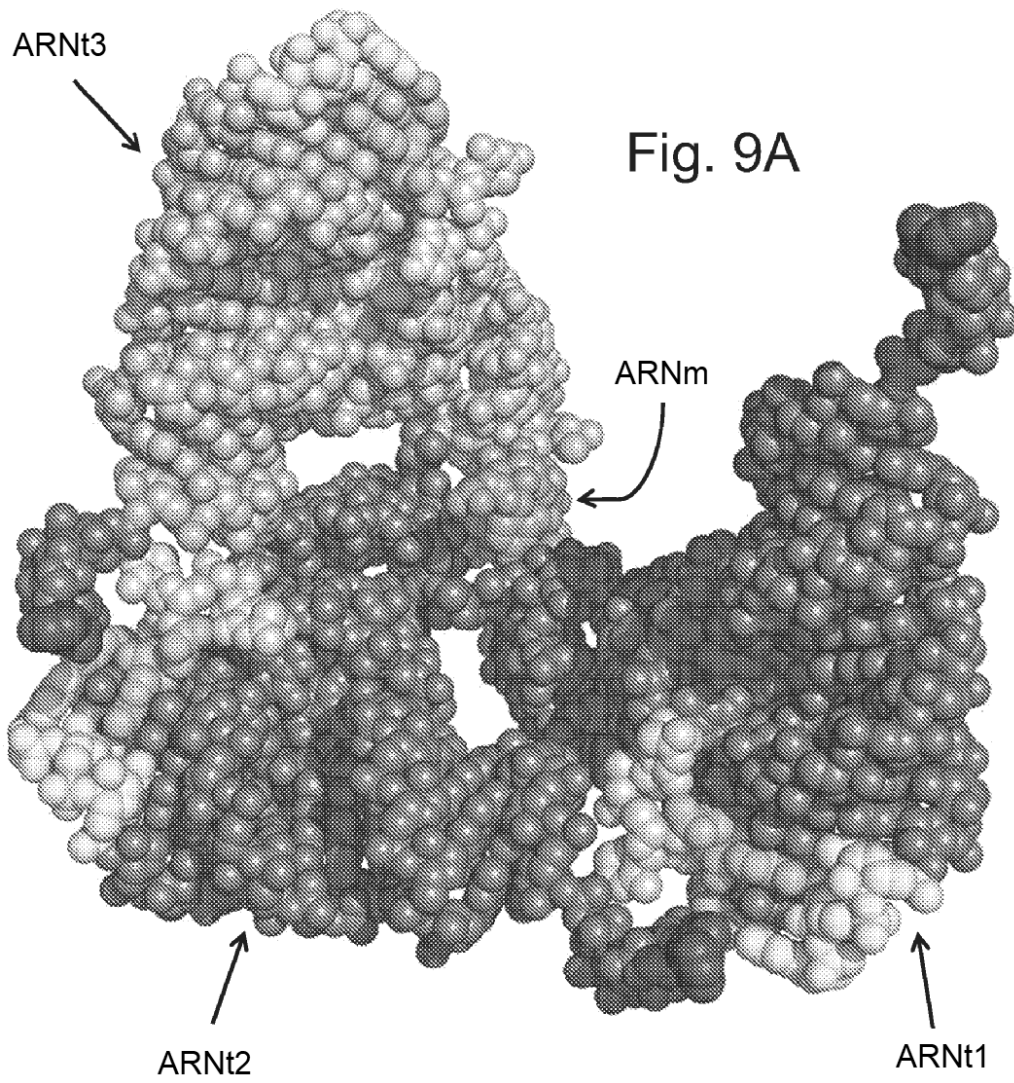


Fig. 9B

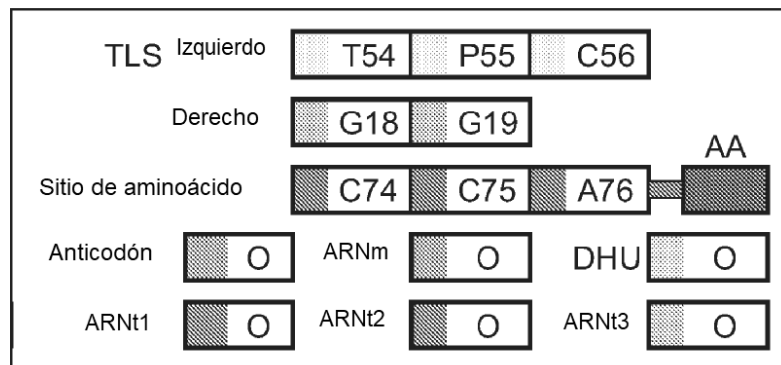


Fig. 10A

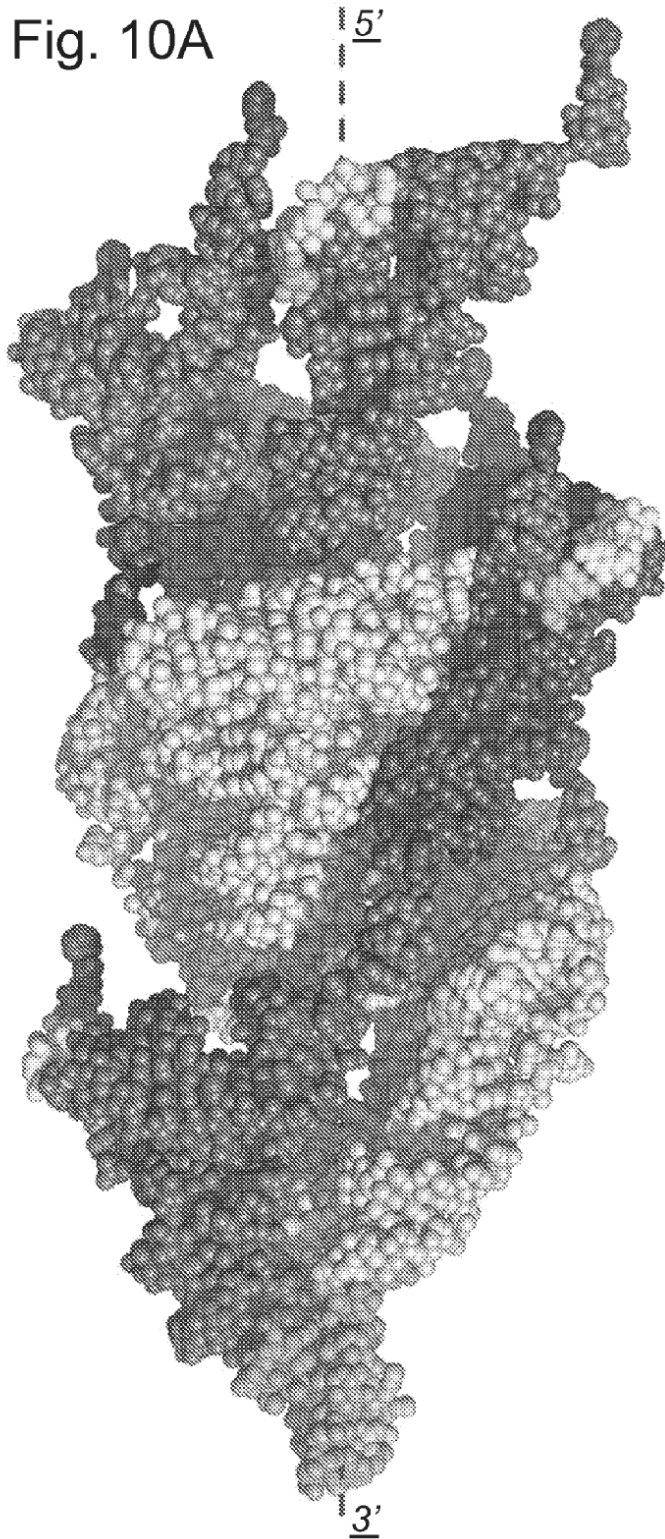







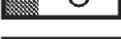
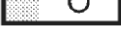



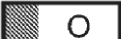


Fig. 10B

TLS izquierdo	T54
	P55
	C56
TLS derecho	G18
	G19
Sitio de AA	C74
	C75
	A76
Aminoácido	
Anticodón	
ARNm	
ARNt1	
ARNt2	
ARNt3	
ARNt4	
ARNt5	
ARNt6	
ARNt7	
ARNt8	
ARNt9	
ARNt10	

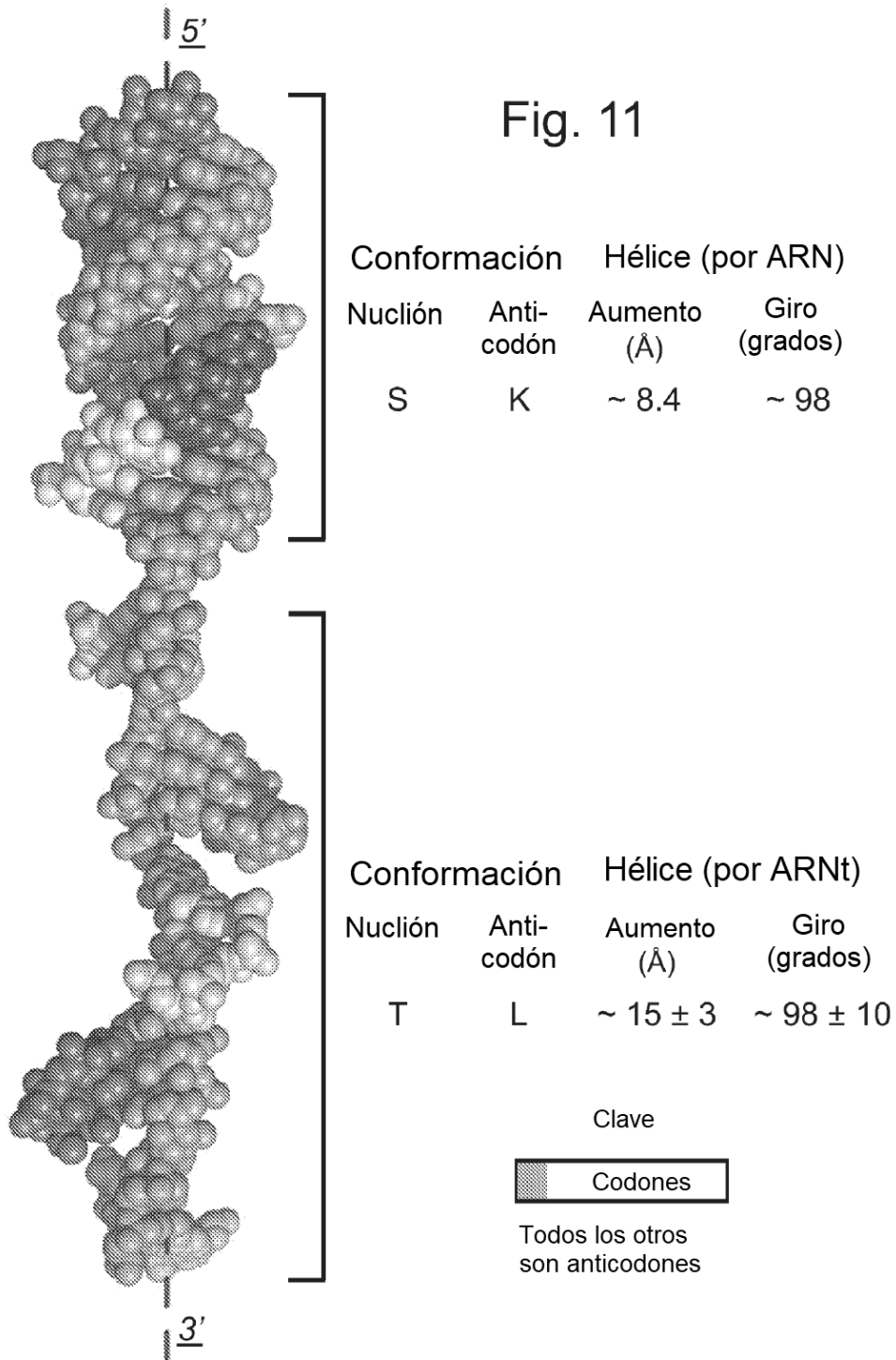


Fig. 12A

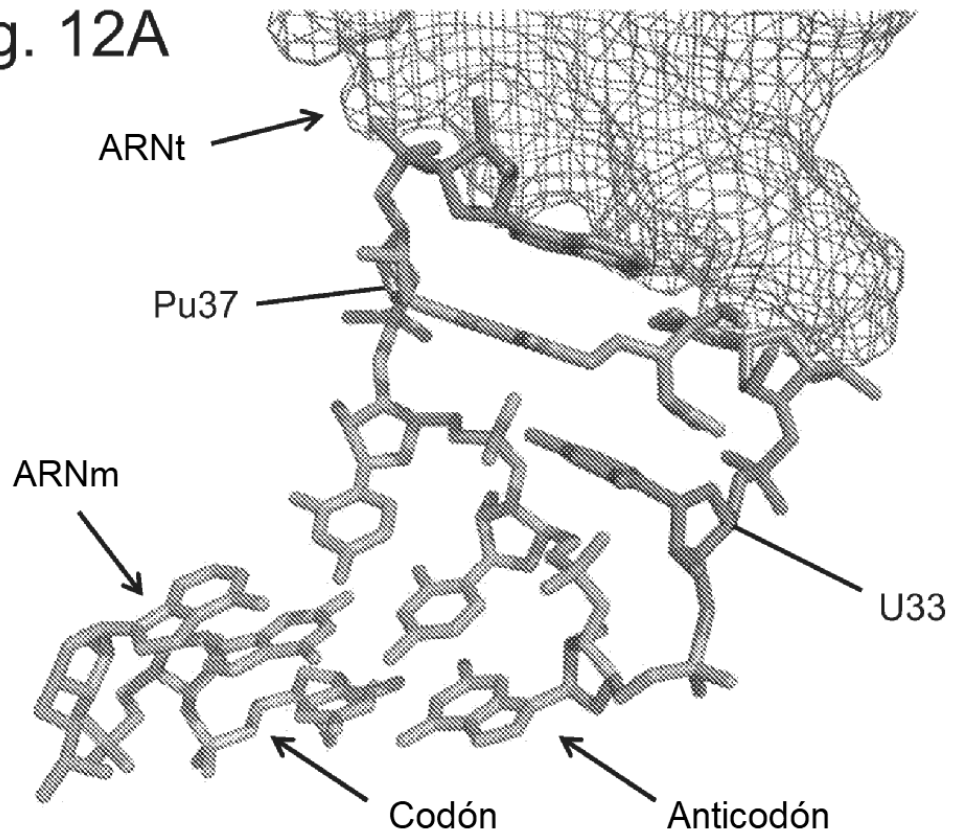
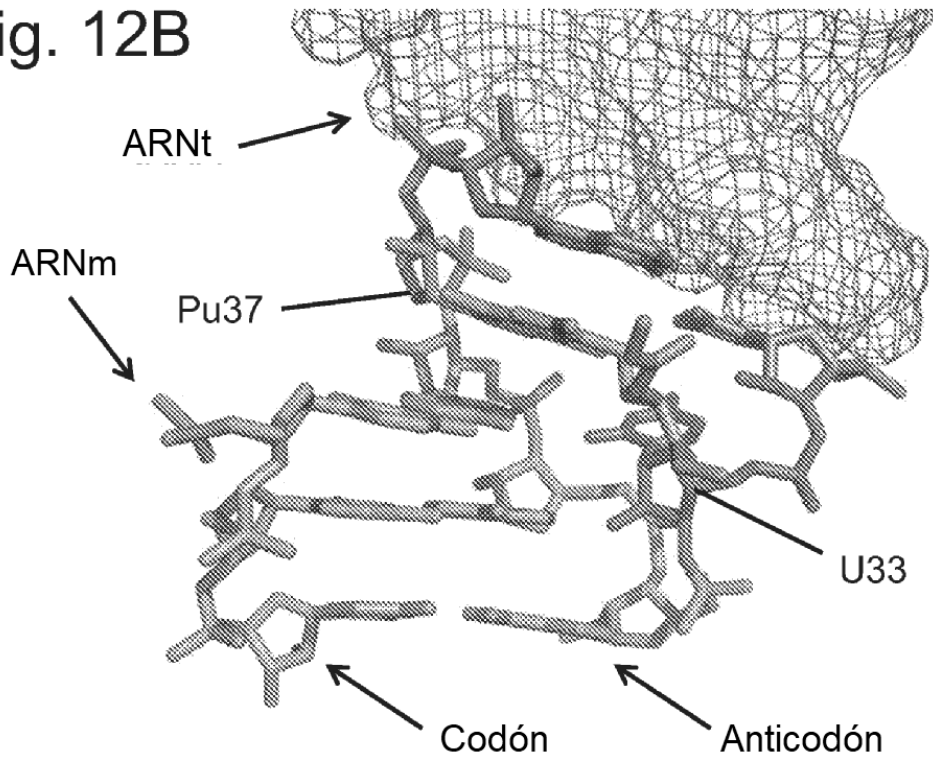


Fig. 12B



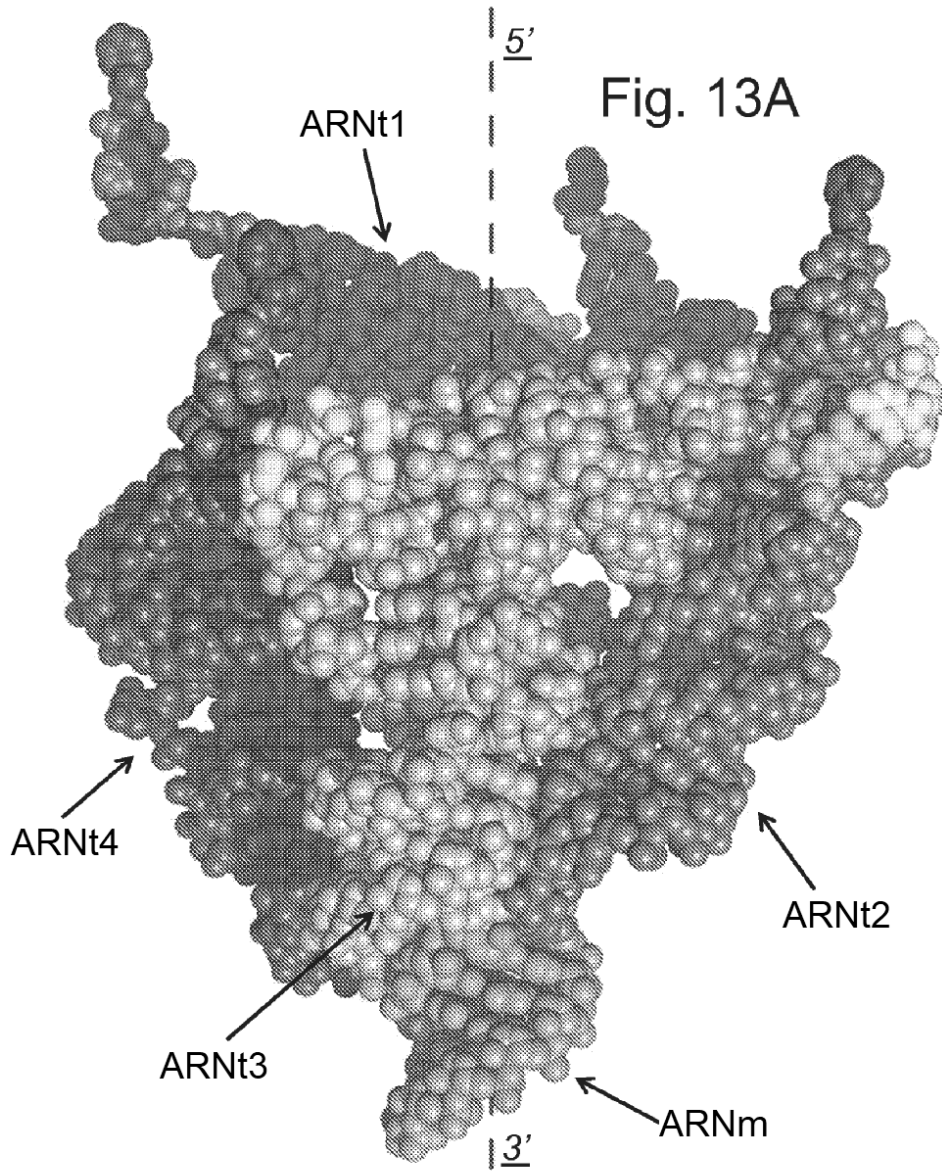
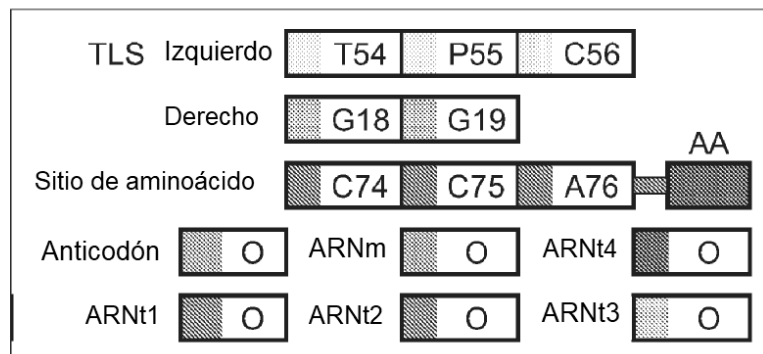


Fig. 13B





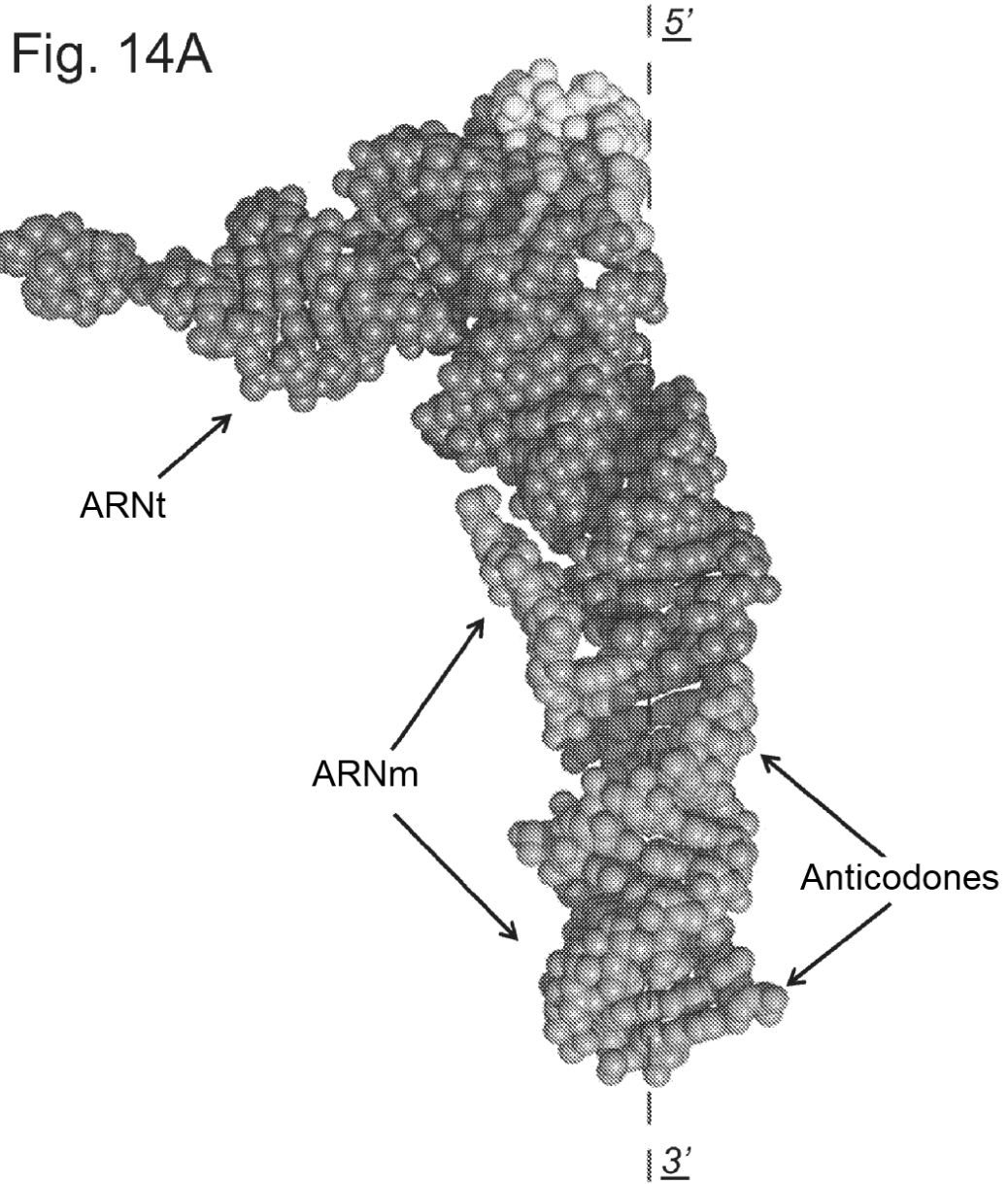


Fig. 14B

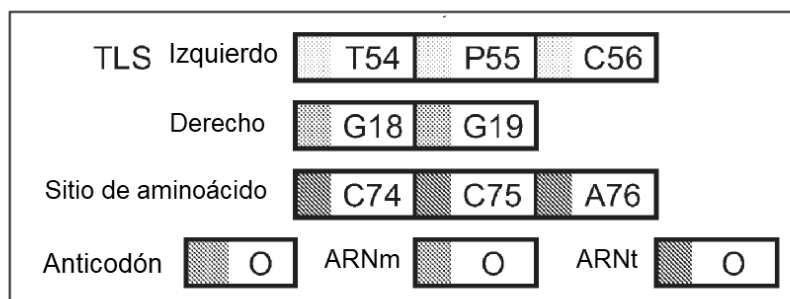




Fig. 16

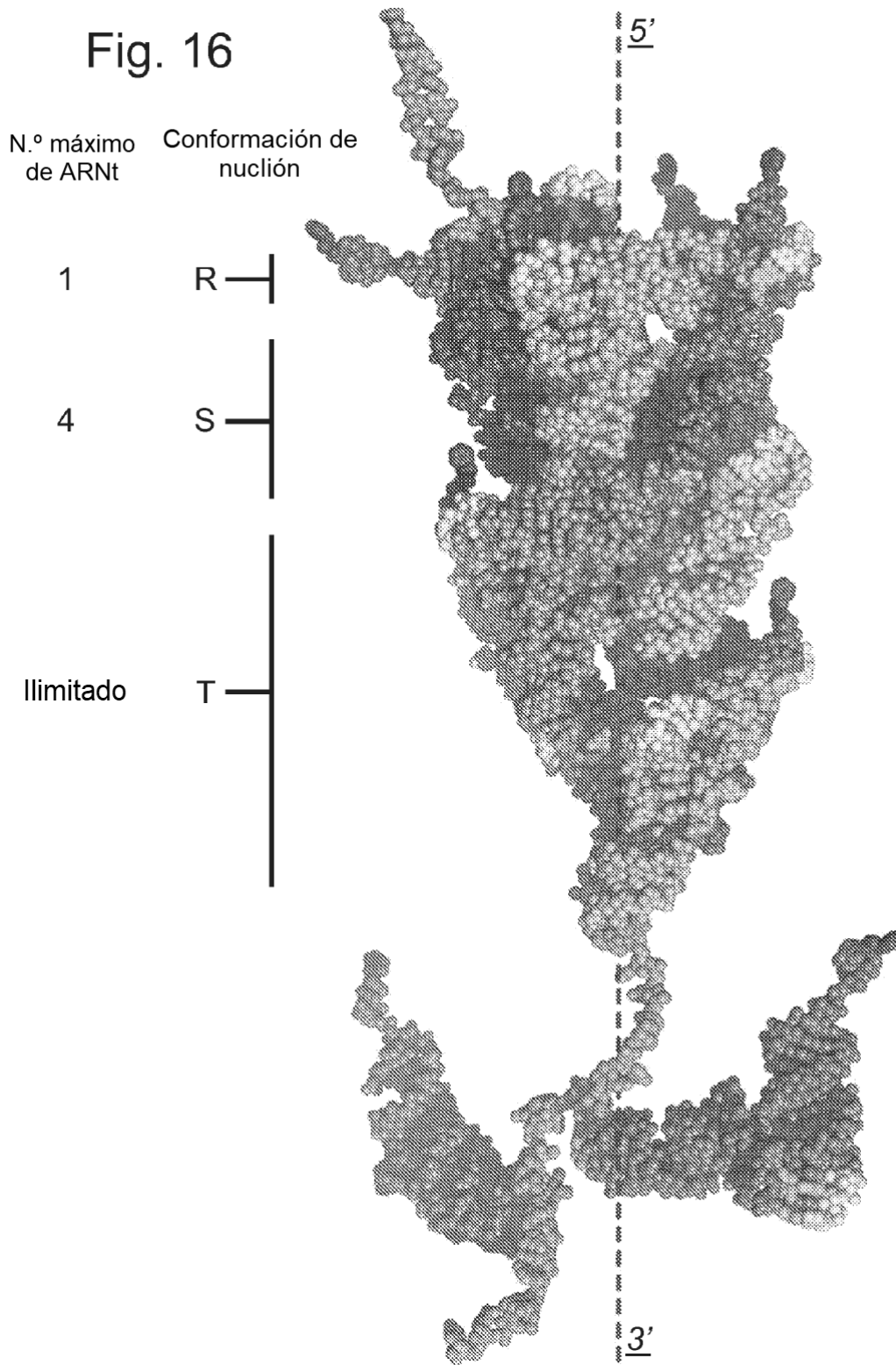


Fig. 17

Conformación de nuclión	R	S	T
Número máximo de ARNt adyacentes con la conformación designada	1	4	Ilimitado
Giro por ARNt (alrededor del eje del nuclión)	Tapa	$\sim 98^\circ$	$\sim 98 \pm 10^\circ$
Aumento por ARNt (a lo largo del eje del nuclión)	$\sim 8,4 \text{ \AA}$	$\sim 8,4 \text{ \AA}$	$\sim 15 \pm 3 \text{ \AA}$
Conformación de bucle anticodón en ARNt	L	K	L
Pilas de anticodones con tallo anticodón	Sí	No	Sí
Pila de anticodones adyacentes	Sí	Sí	No
Pila de codones adyacentes	Sí	Sí	No
Nucleótidos apilados por ARNt*	$\sim T + 8$	$\sim T + 6$	$\sim T + 5$
Pares de bases acumulados en el eje del nuclión **	B	$\sim B + 3 \times S$	$\sim B + 12 + 3 \times T$
Dipolo a lo largo del eje del nuclión	Sí	Sí	Menor

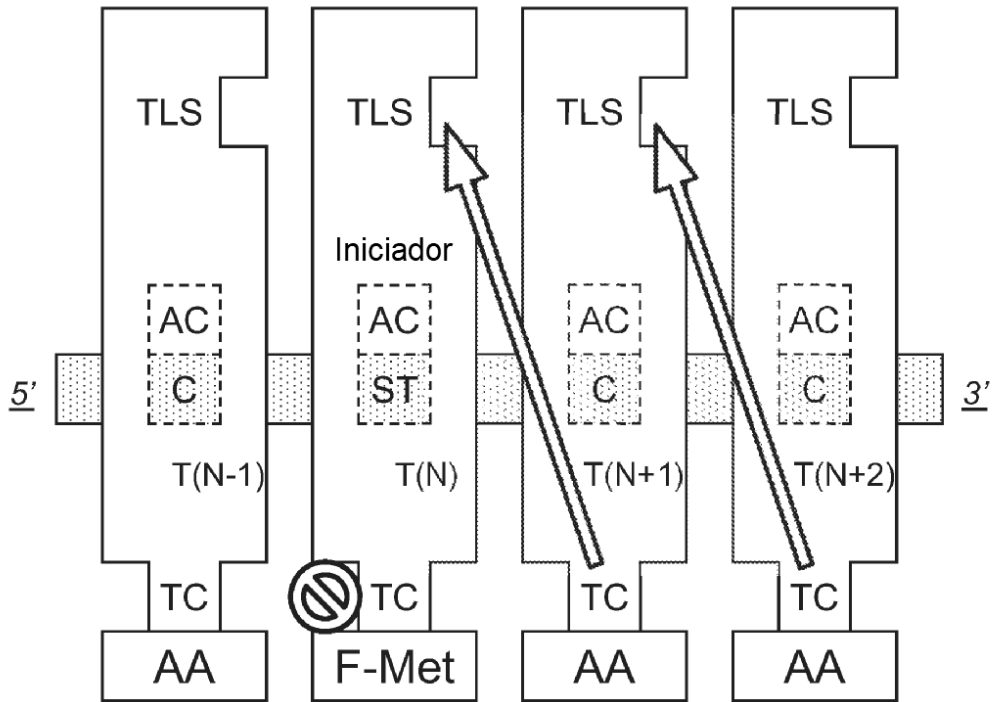
## Clave

\* (i) Excluye apilamiento de nucleótidos adicional en el codo

(ii) T = número de nucleótidos apilados en ARNt libre no unido al nuclión

\*\* B = N.º de pares de bases axiales en la tapa de R-ARNt y codón-anticodón asociado

El símbolo  $\sim$  significa sustancialmente en el intervalo del número indicado.



Bacterias (y orgánulos eucariotas relacionados)

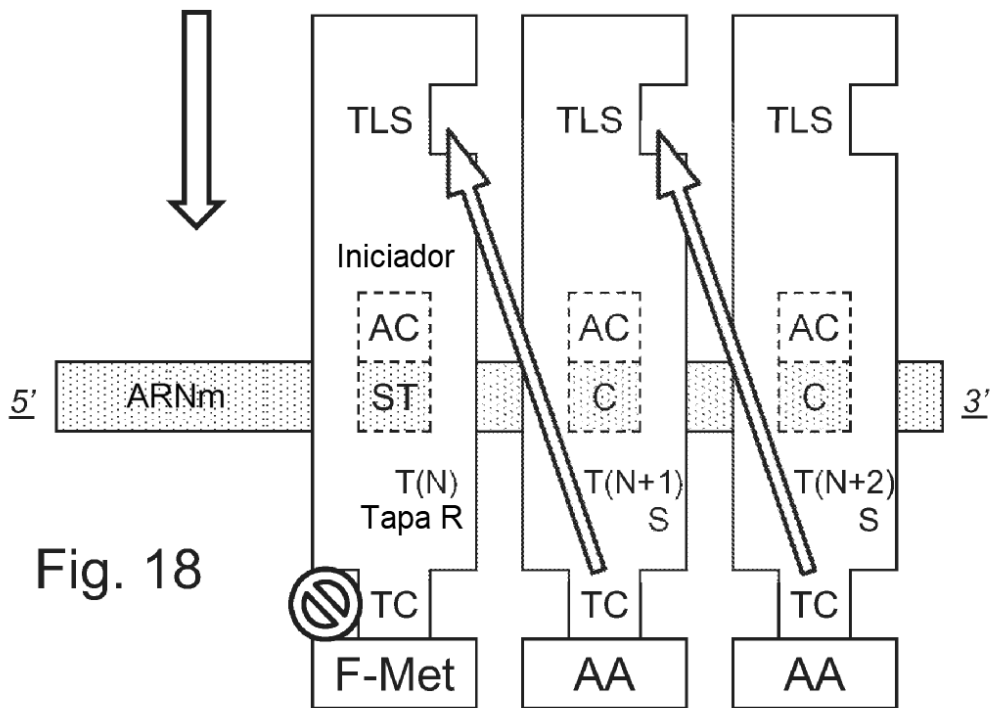
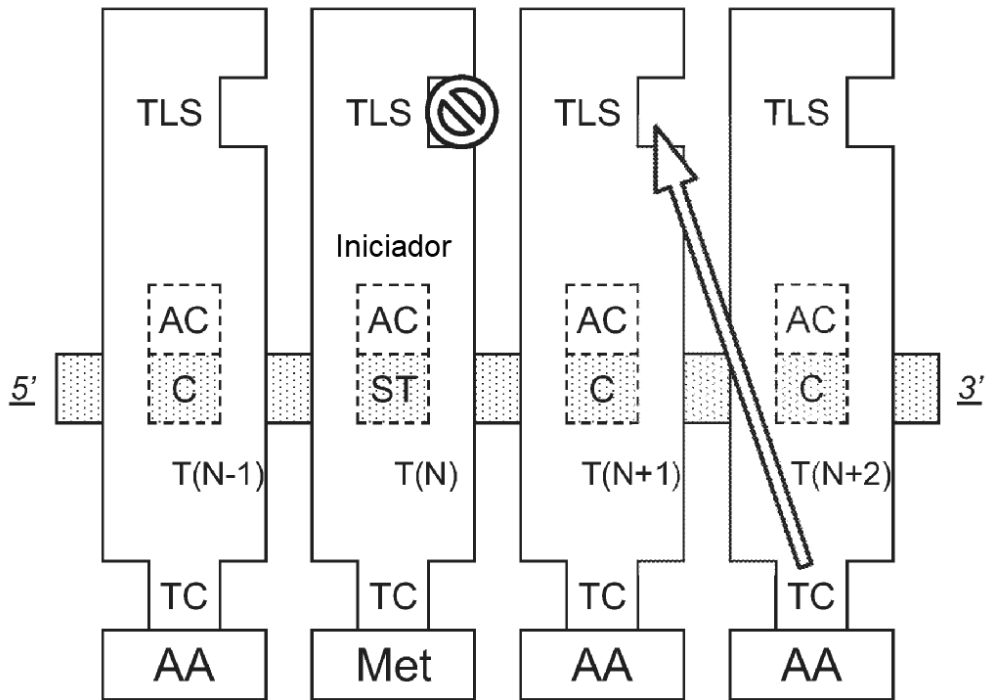


Fig. 18



Eucariotas (citoplasma)

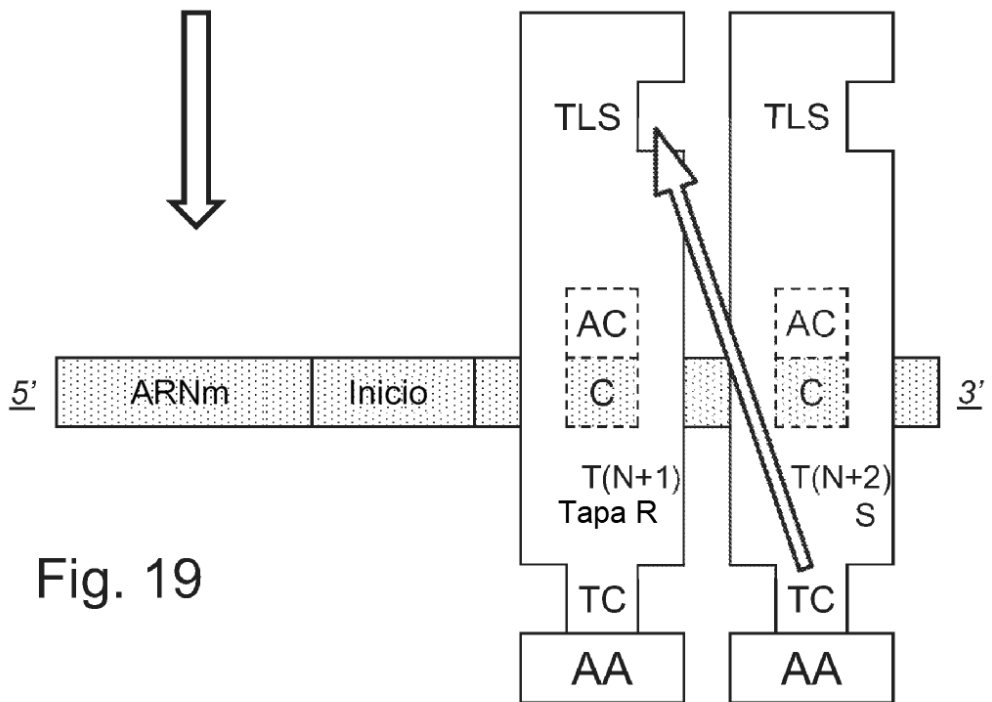


Fig. 19

Fig. 20A

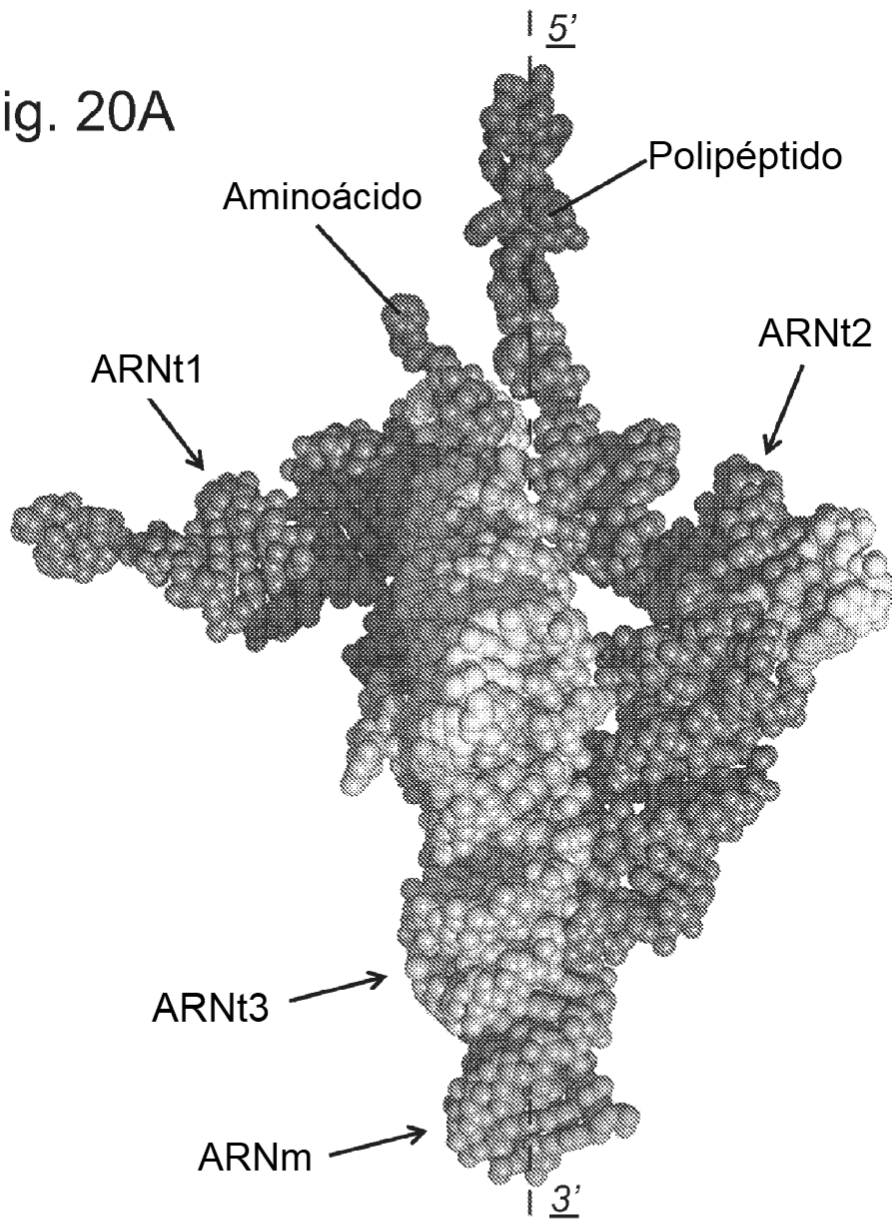
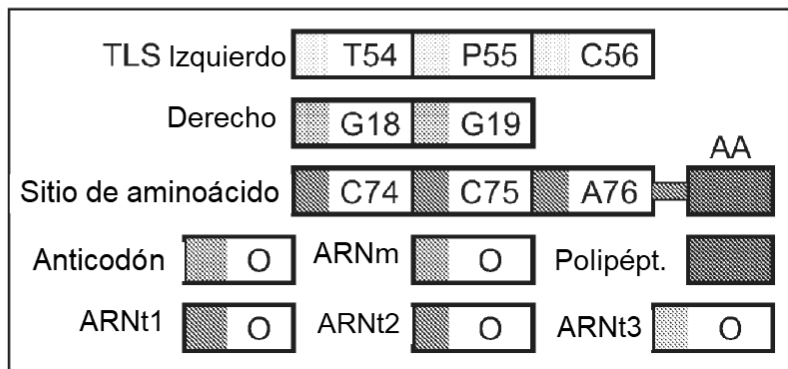


Fig. 20B



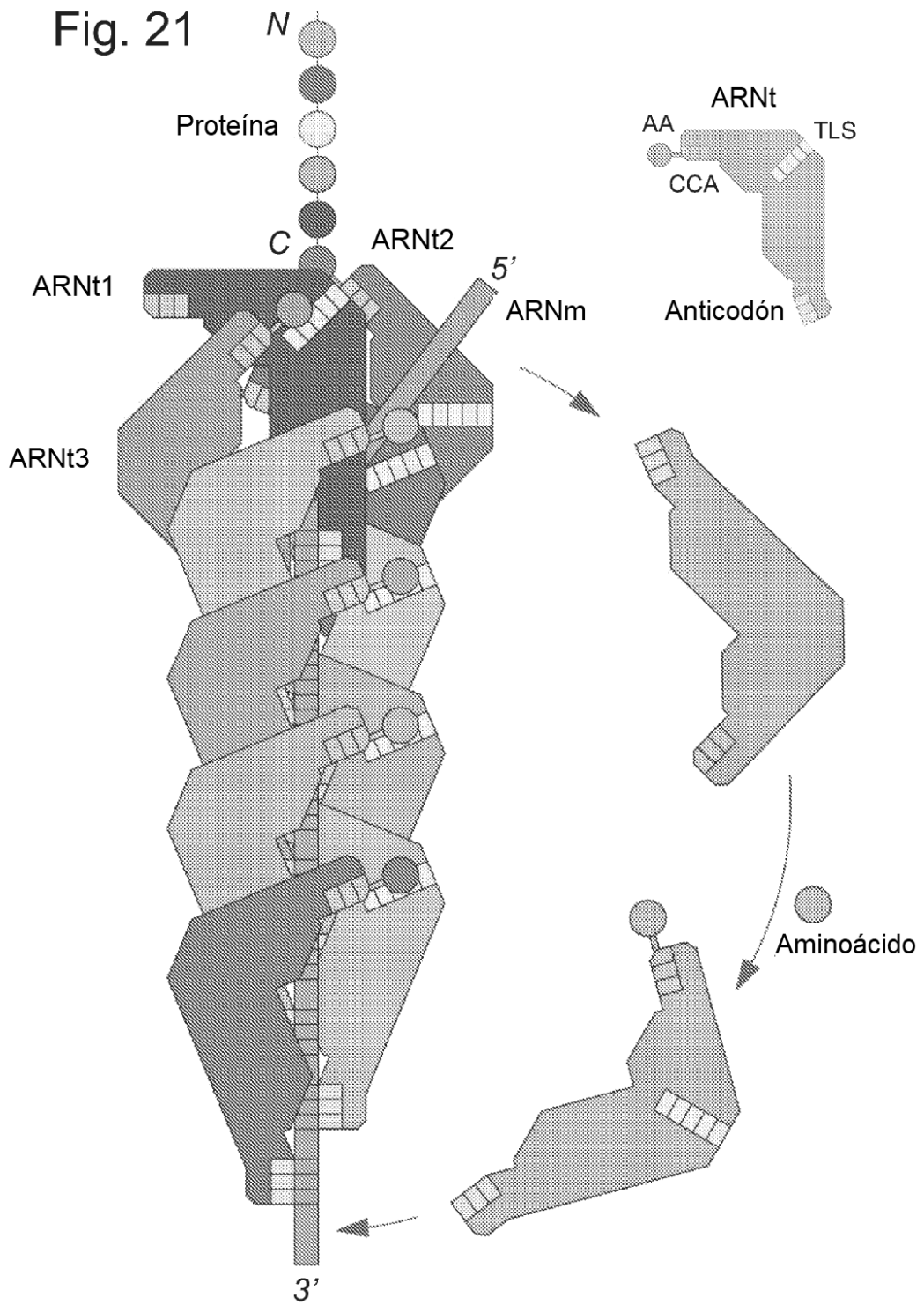
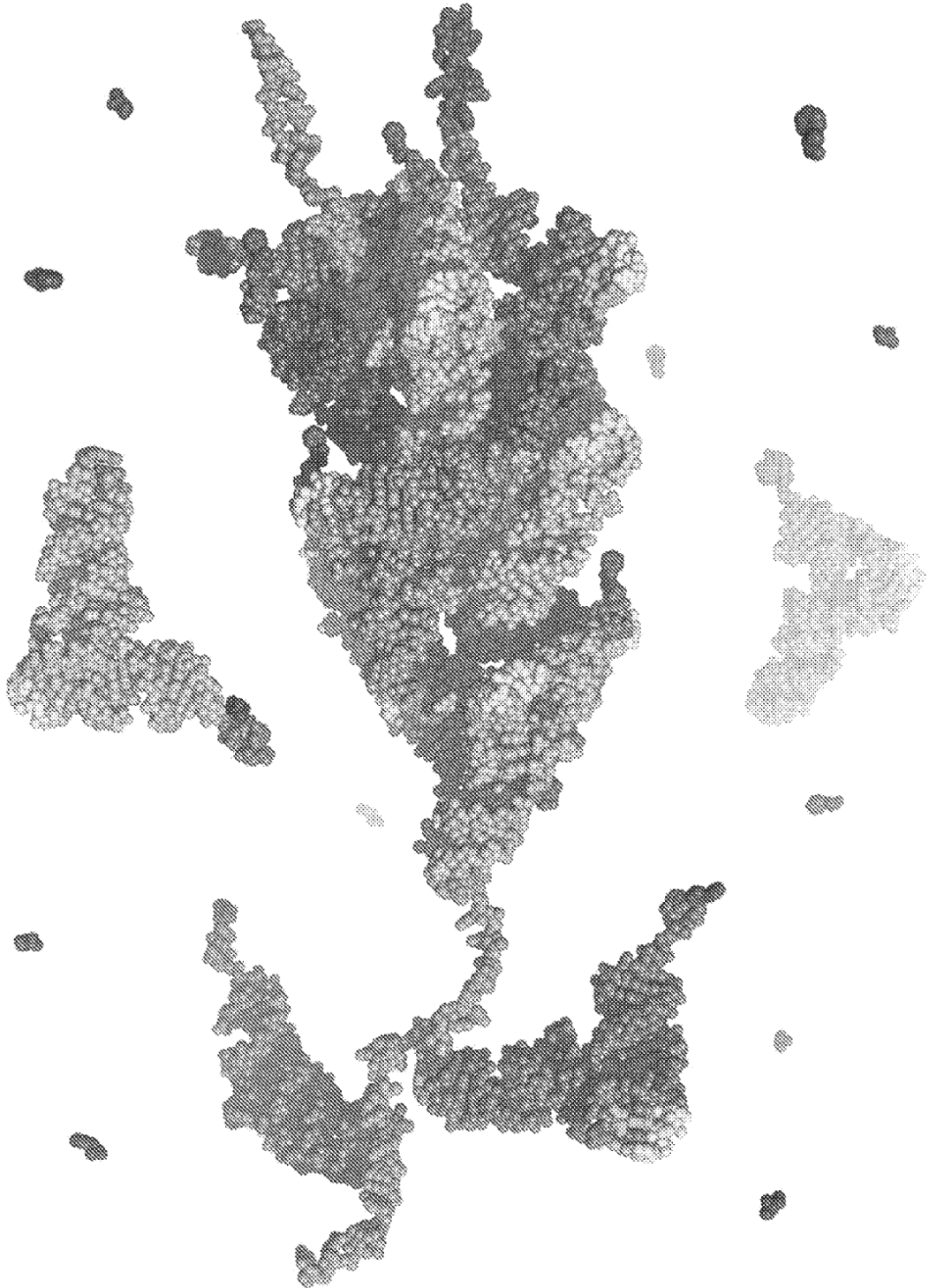
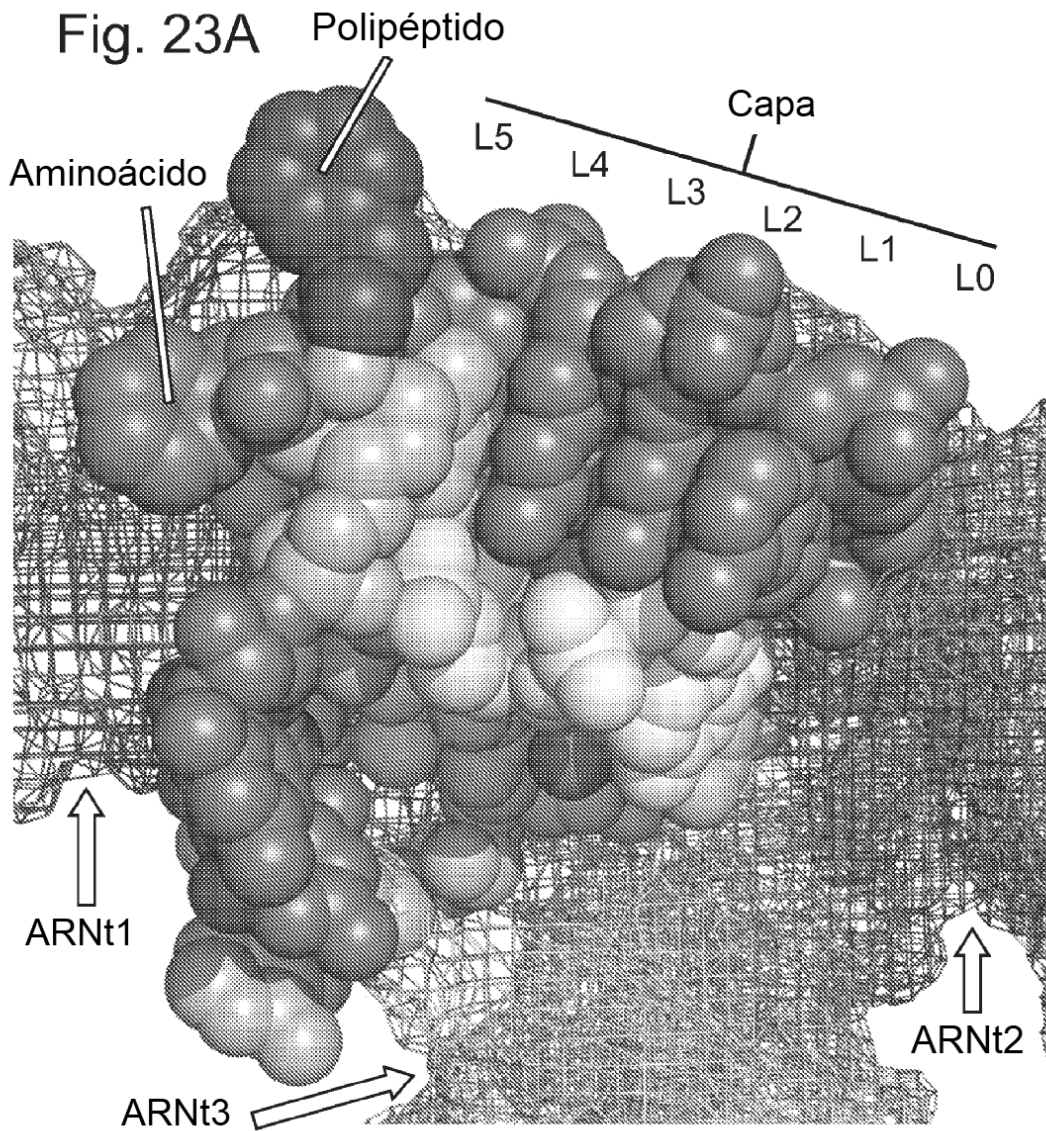


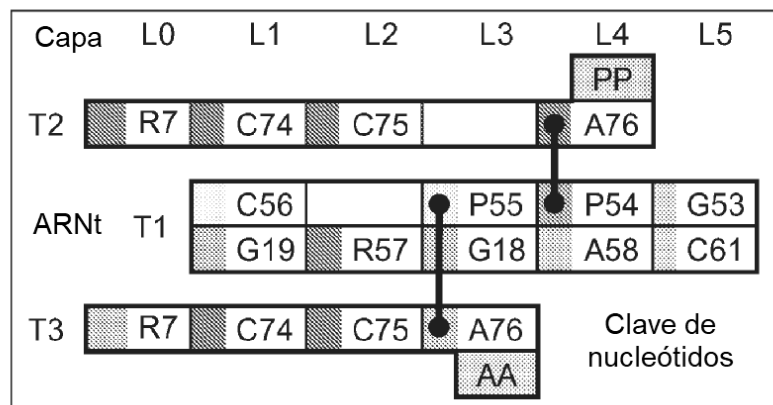


Fig. 22





**Fig. 23B**



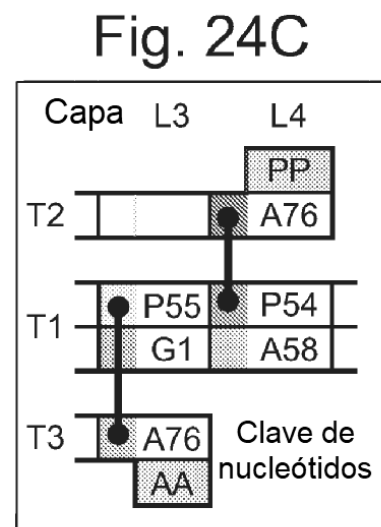
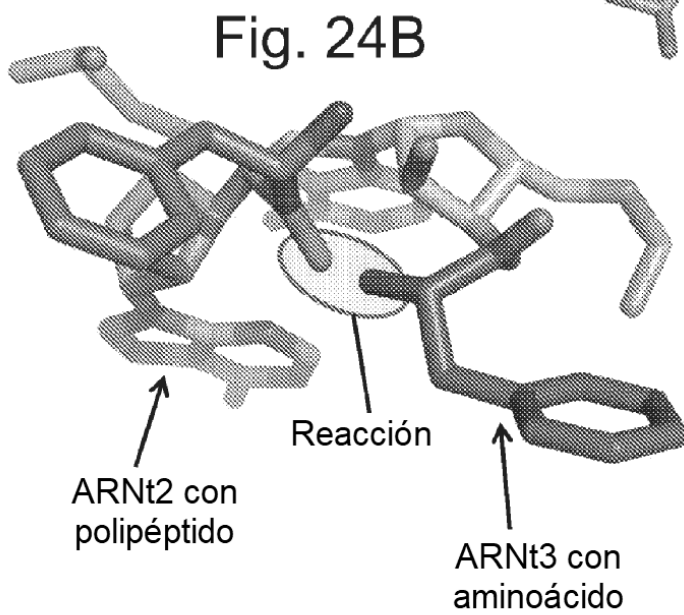
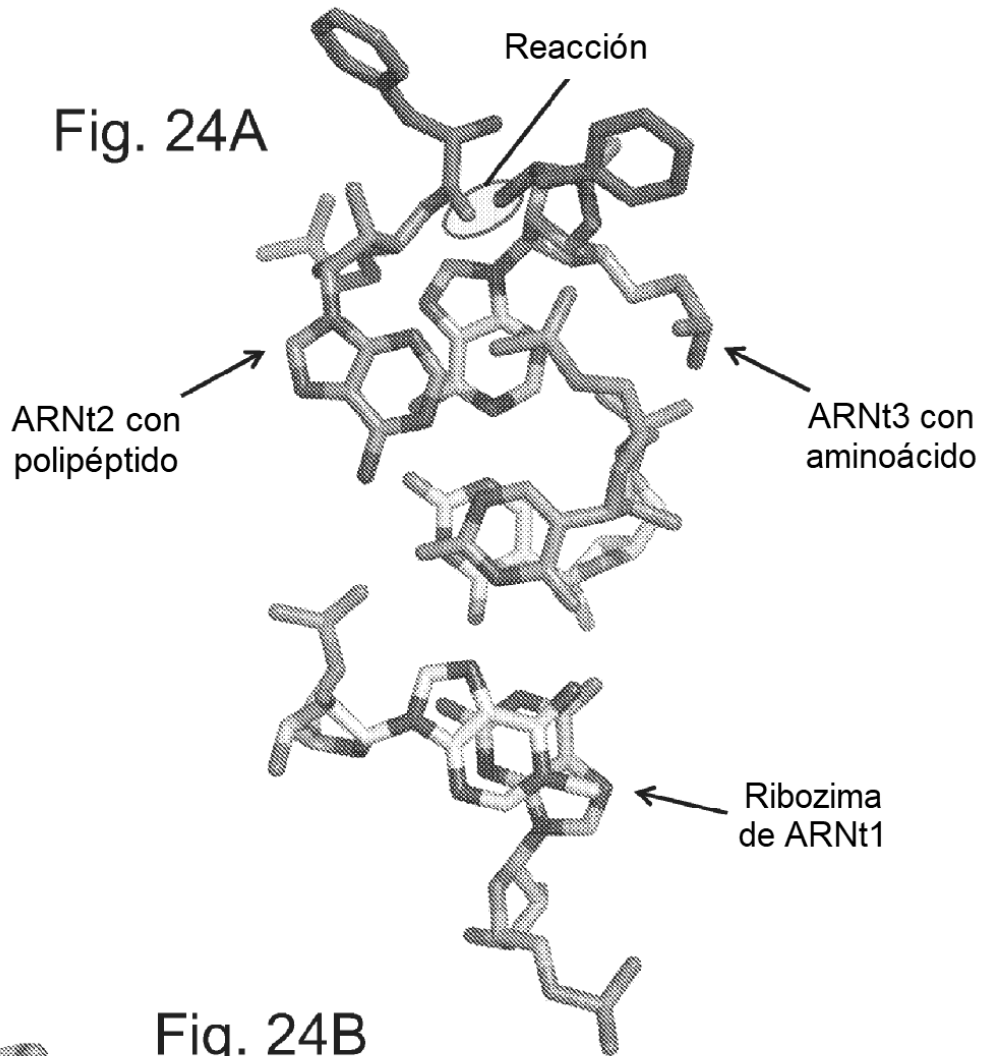


Fig. 25B

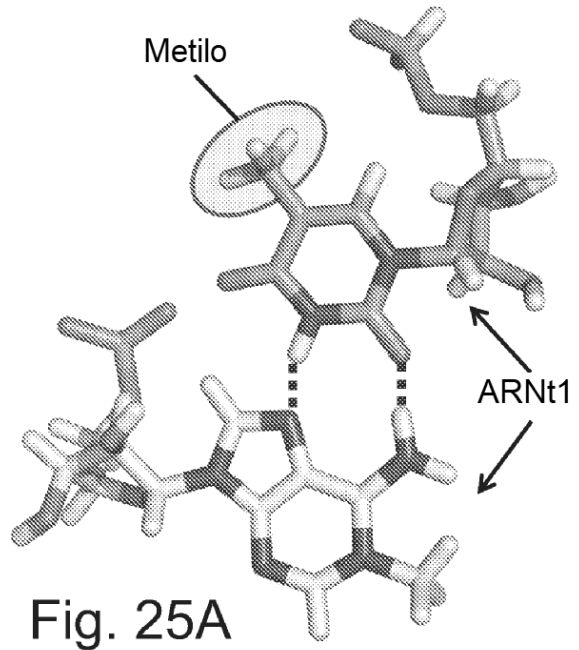
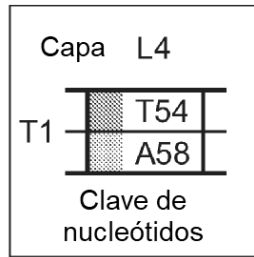


Fig. 25A

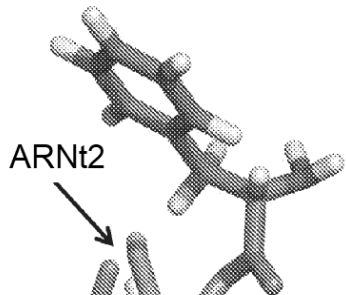


Fig. 25C

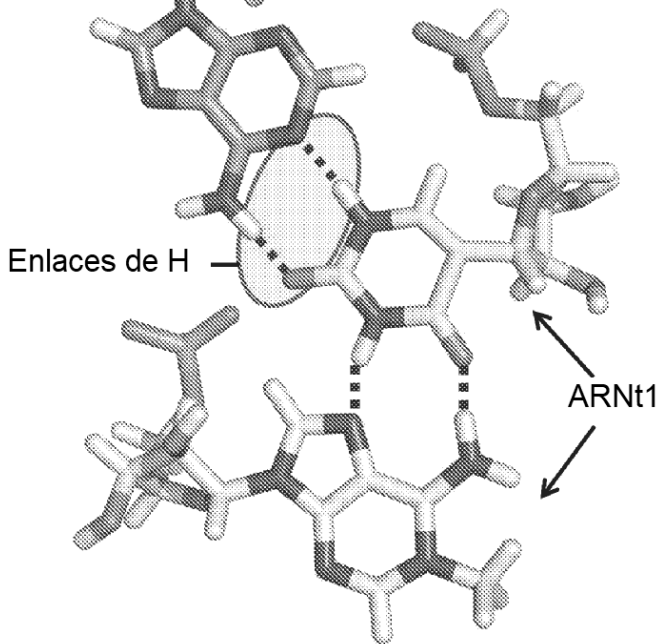


Fig. 25D

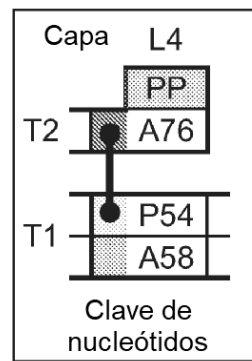


Fig. 26

Clase de ARNt (N) en el codón de ARNm (N)	Nucleótido en ARNt (N) en la posición		Grupo formilo en el aminoácido en ARNt (N)	Forma de nuclión en el codón (N)	Estados de TLS en ARNt (N)				CCA de aminoácido se une a TLS en ARNt	Resultado
	54	55			TLS izquierdo		TLS derecho			
					Estado	Se une	Estado	Se une		
Elongador (todos)	U*	P	No	S o T	Apa-gado	-	Encen-dido	N+1	N-1	Ribocápside
Iniciador (bacterias)	U*	P	Sí	R	Apa-gado	-	Encen-dido	N+1	<del>X</del>	Marca de iniciación
Iniciador (eucariotas)	A	P	No	Ninguno	Apa-gado	-	Apa-gado	<del>X</del>	-	Marca de iniciación
Ribozima (ARNt primordial o anormal)	P	P	No	S o T	Apa-gado	-	Encen-dido	N+1	N-1	Ribocápside
				R	Encen-dido	N+1	Encen-dido	N+2	-	Síntesis

Clave

En bacterias (y orgánulos relacionados en eucariotas):

F-met en ARNt (N) iniciador bloquea la unión de CCA de aminoácido a TLS en ARNt (N-1).

En eucariotas (citoplasma):

A54 en TLS en el ARNt (N) iniciador bloquea la unión a CCA de aminoácido en ARNt (N+1).

Códigos de nucleótidos (NT): P (pseudouridina), U\* (uridina o U modificada), A (adenosina)

Formas de nucliones: R (tapa), S (apilado), T (unión inicial).

Quiralidad de TLS: Visto desde el tallo de aminoácido en T(N), con anticodón abajo

Fig. 27A

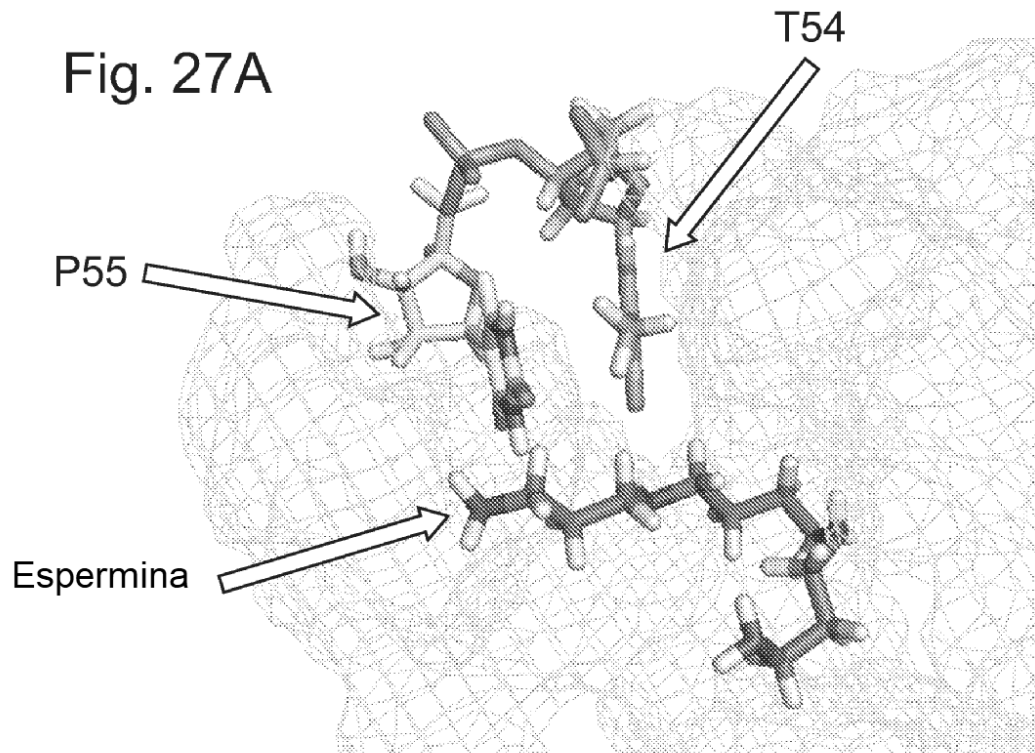


Fig. 27B

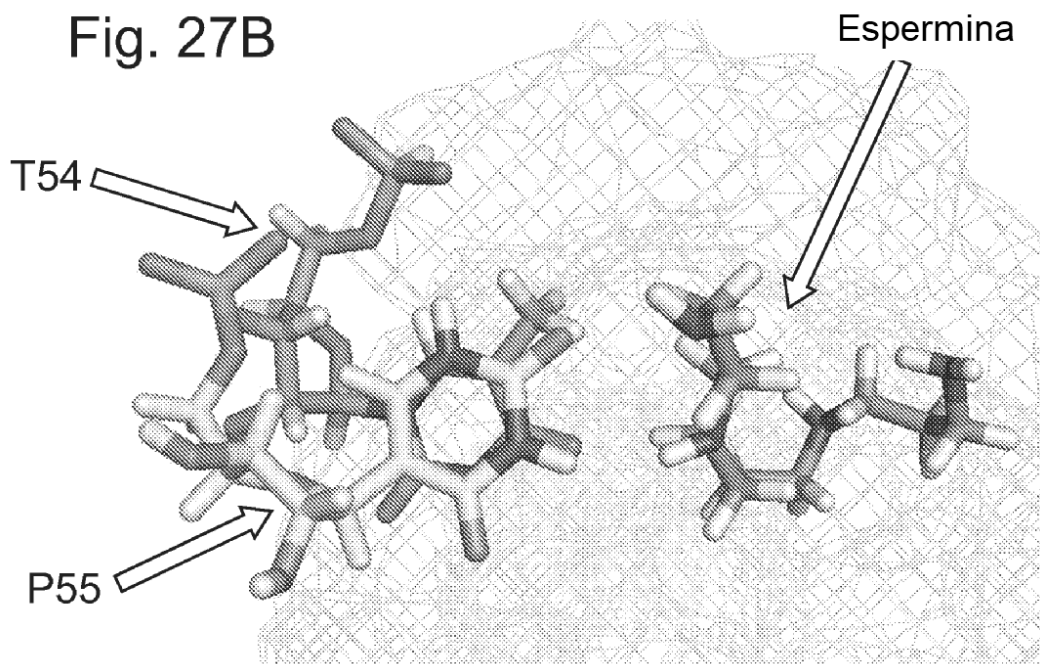


Fig. 28

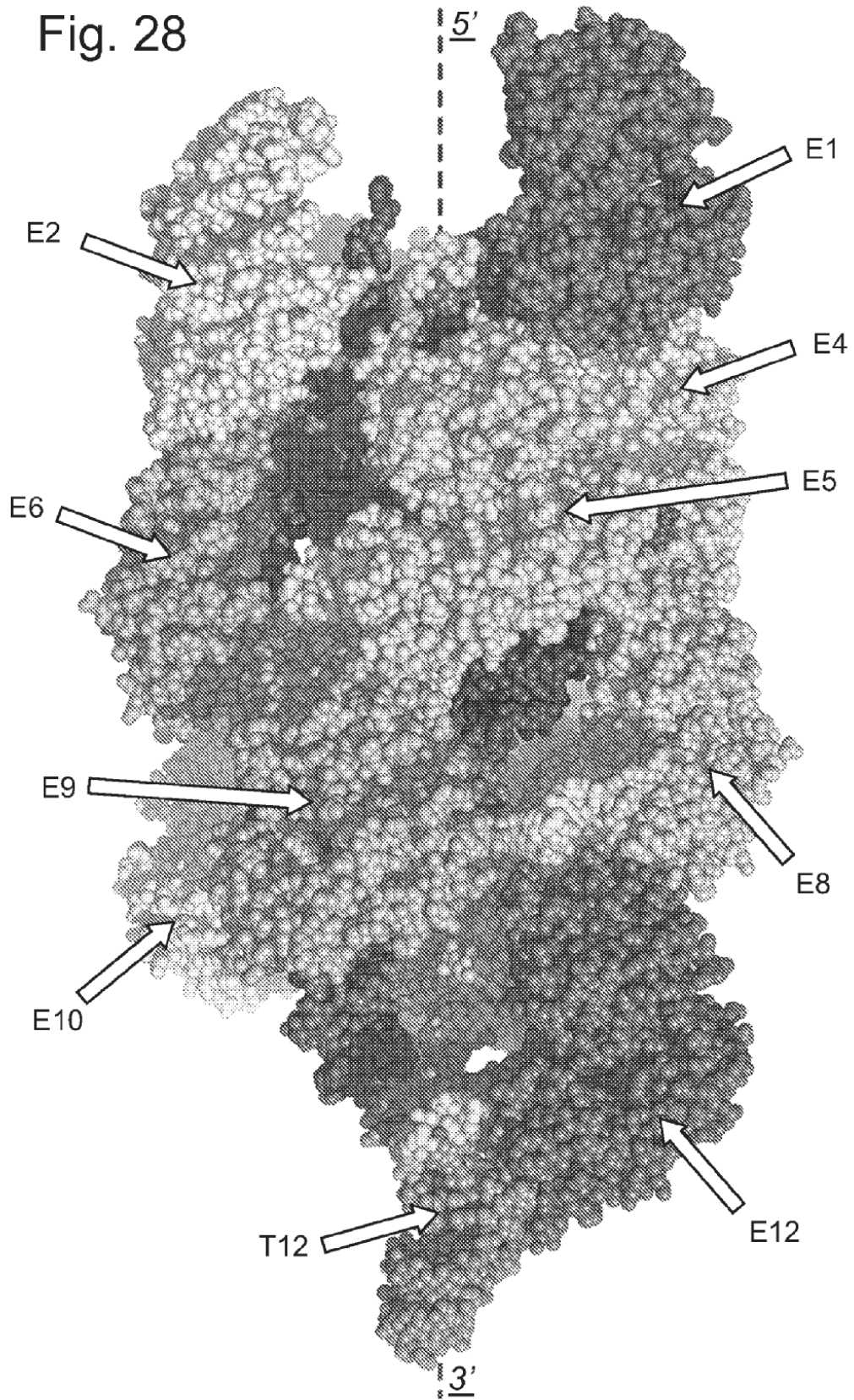


Fig. 29

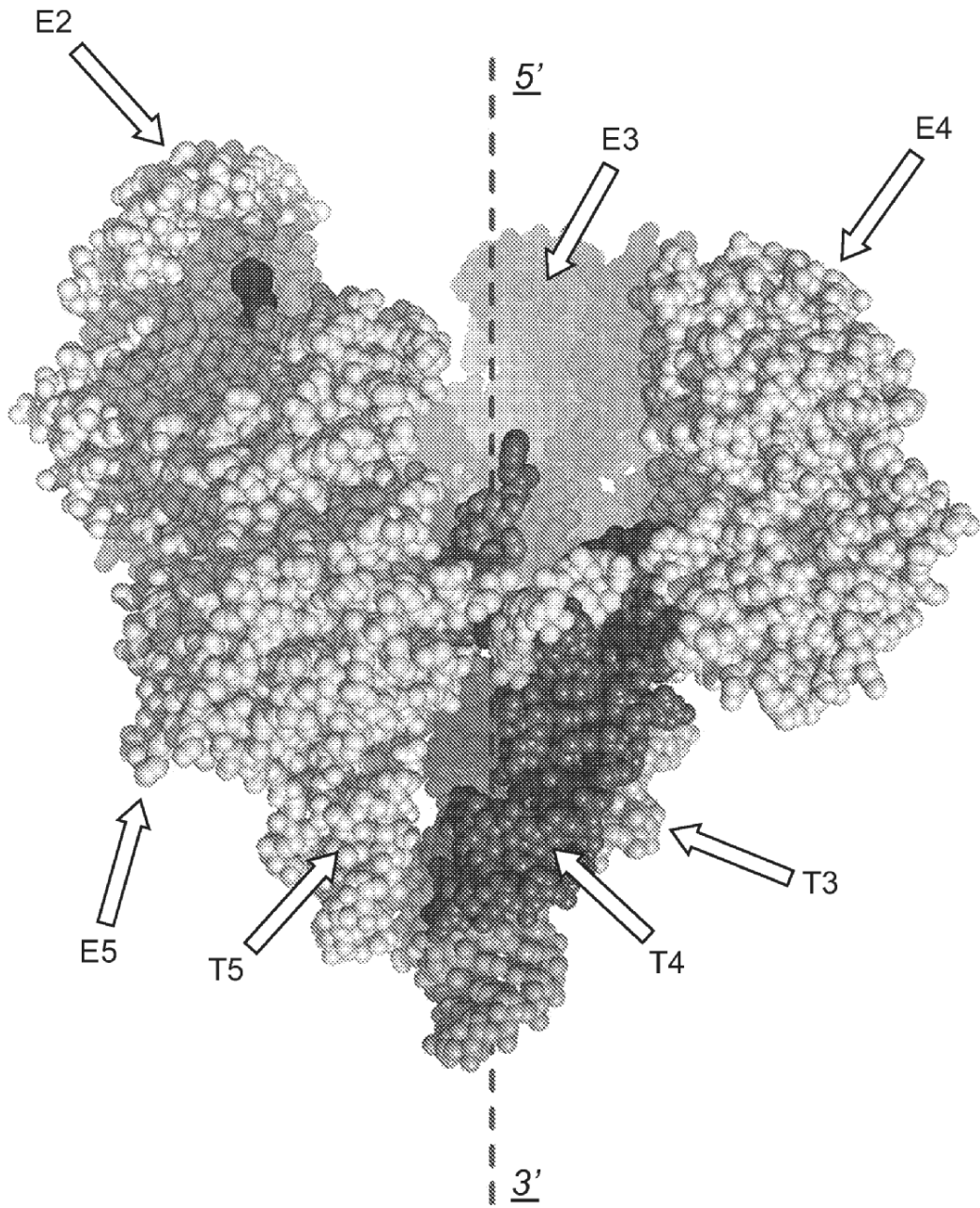




Fig. 30A

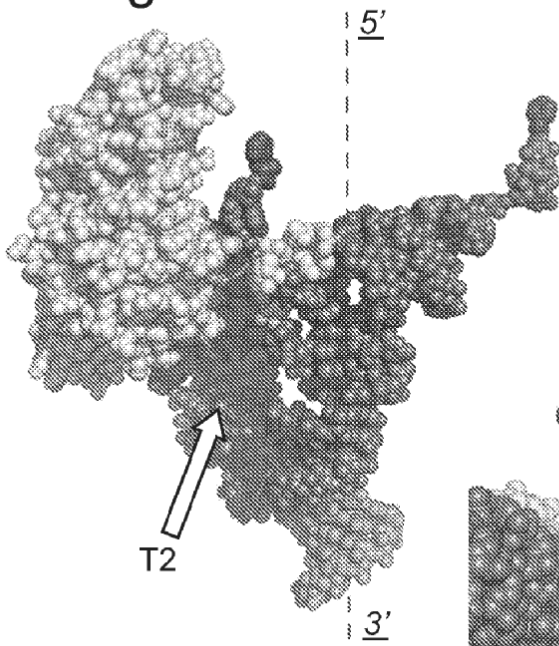


Fig. 30B

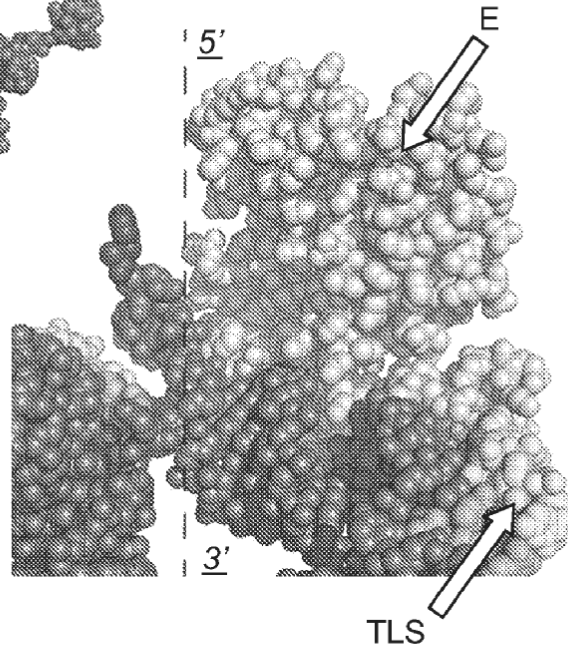


Fig. 30C

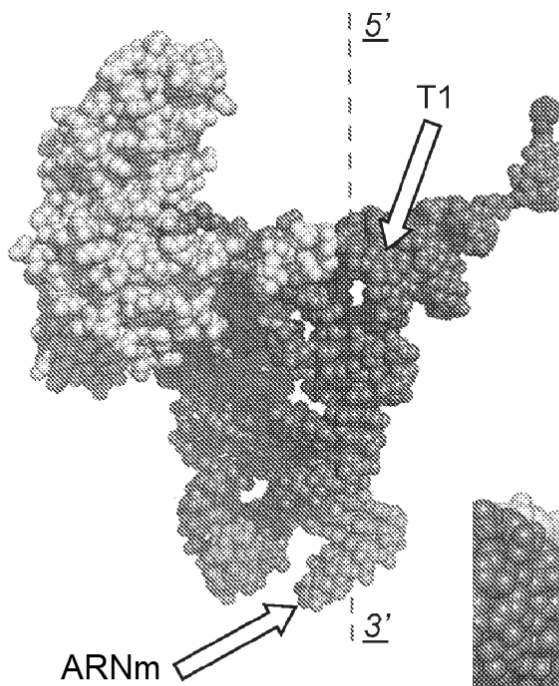
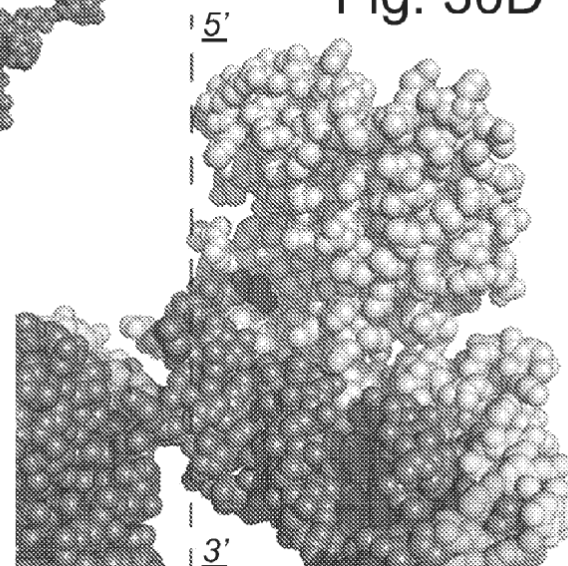
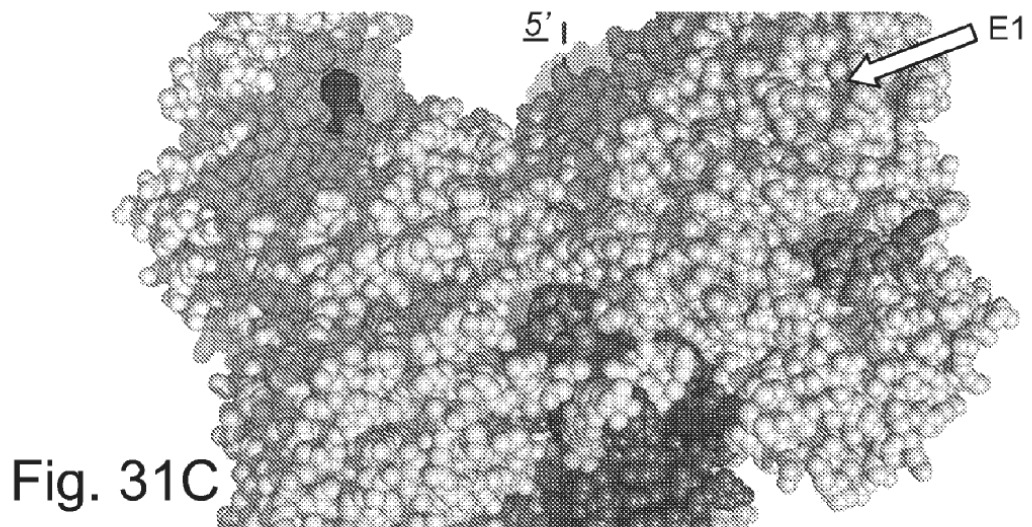
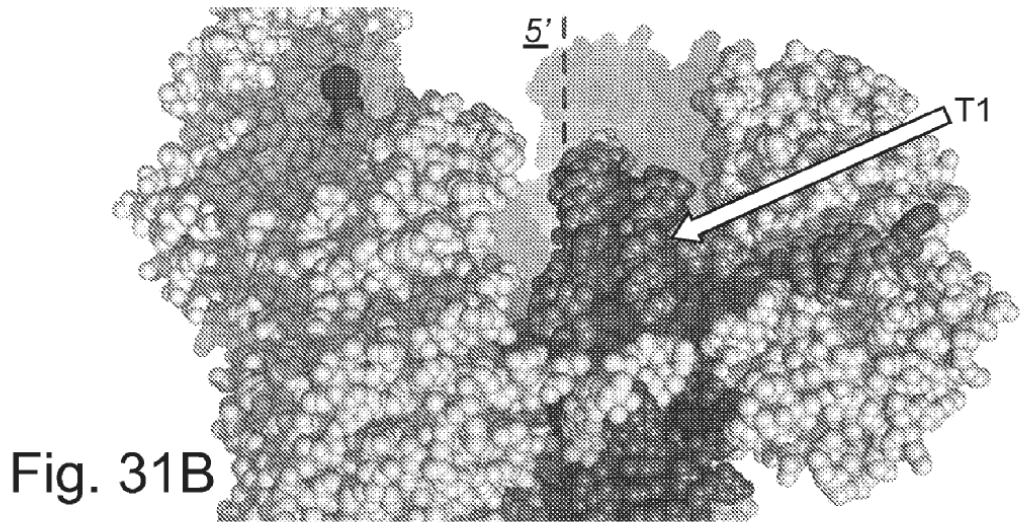
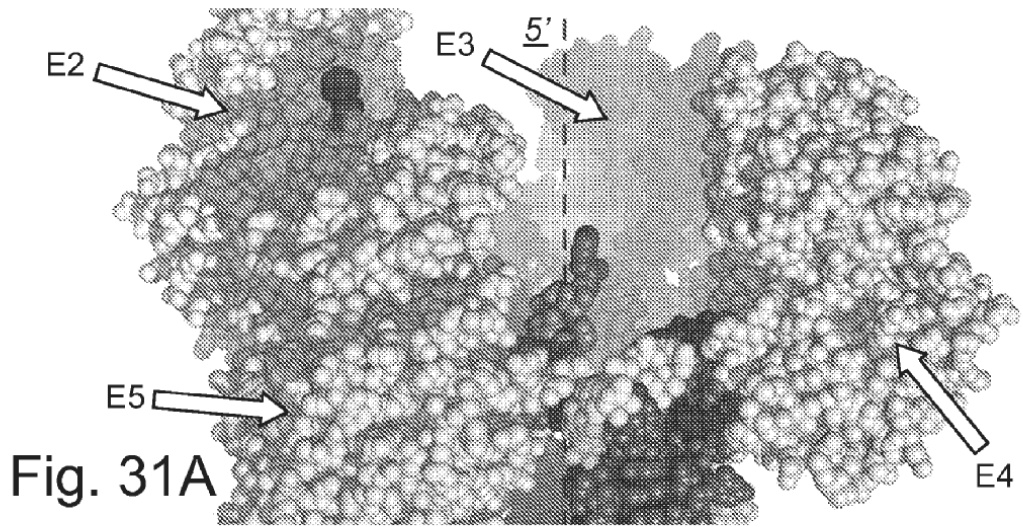


Fig. 30D





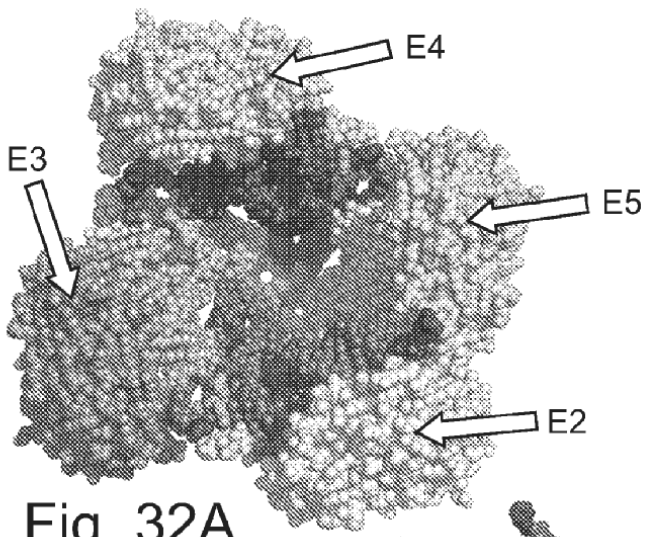


Fig. 32A

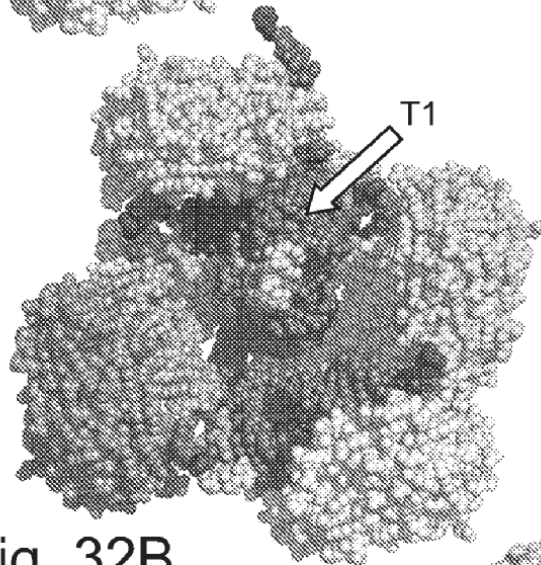


Fig. 32B

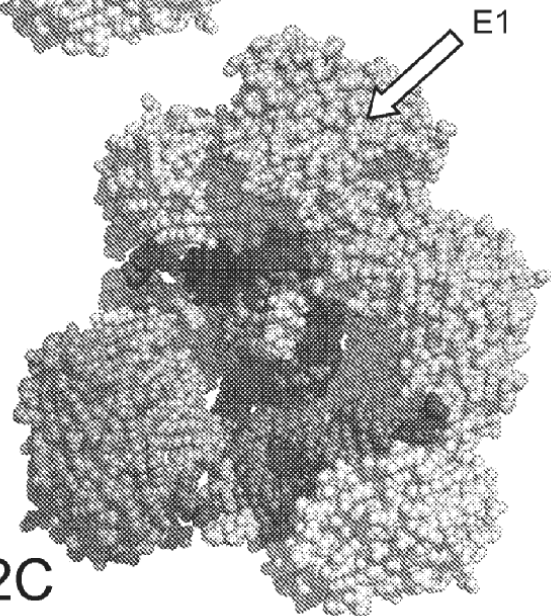
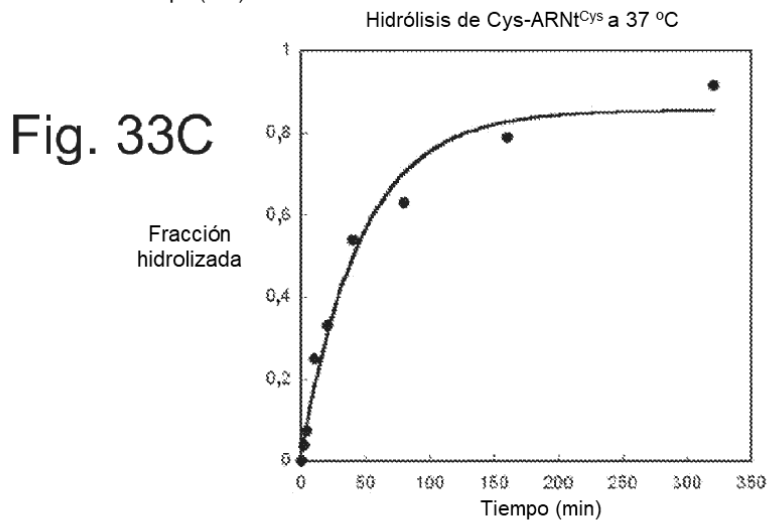
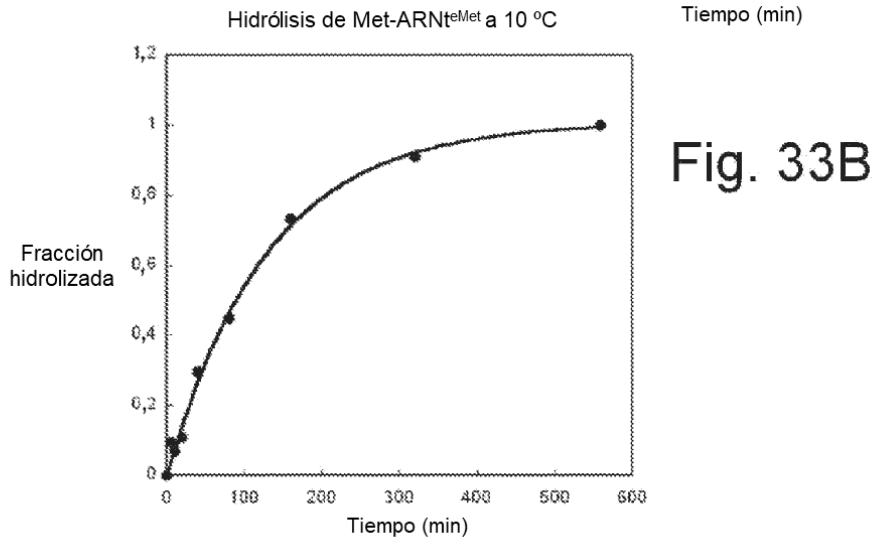
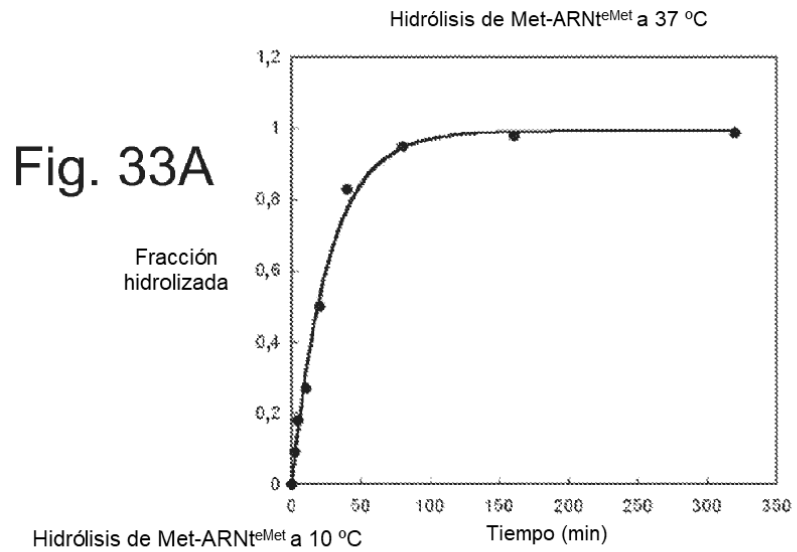


Fig. 32C



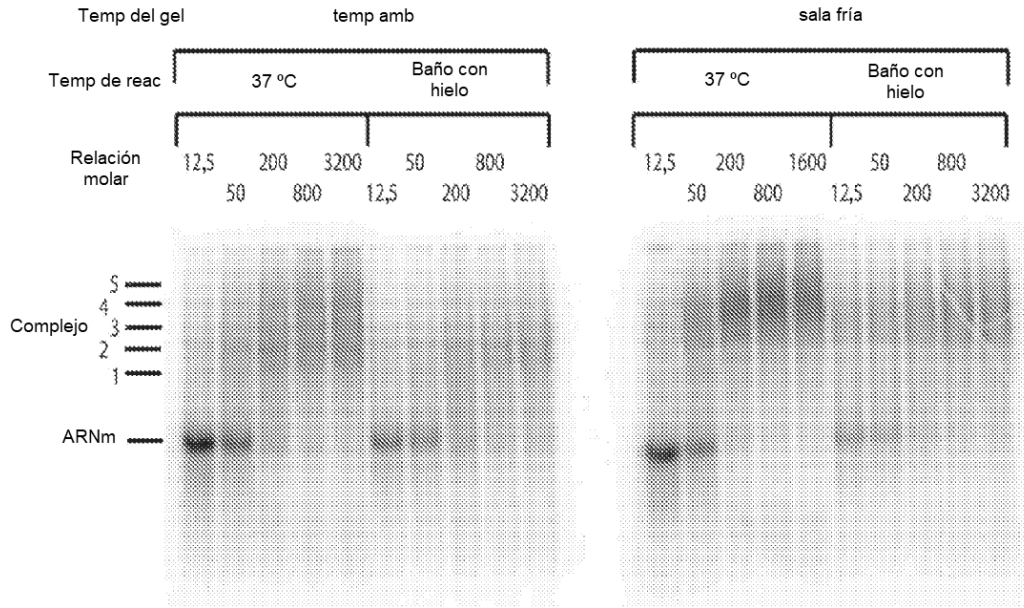


Fig. 34A

Fig. 34B

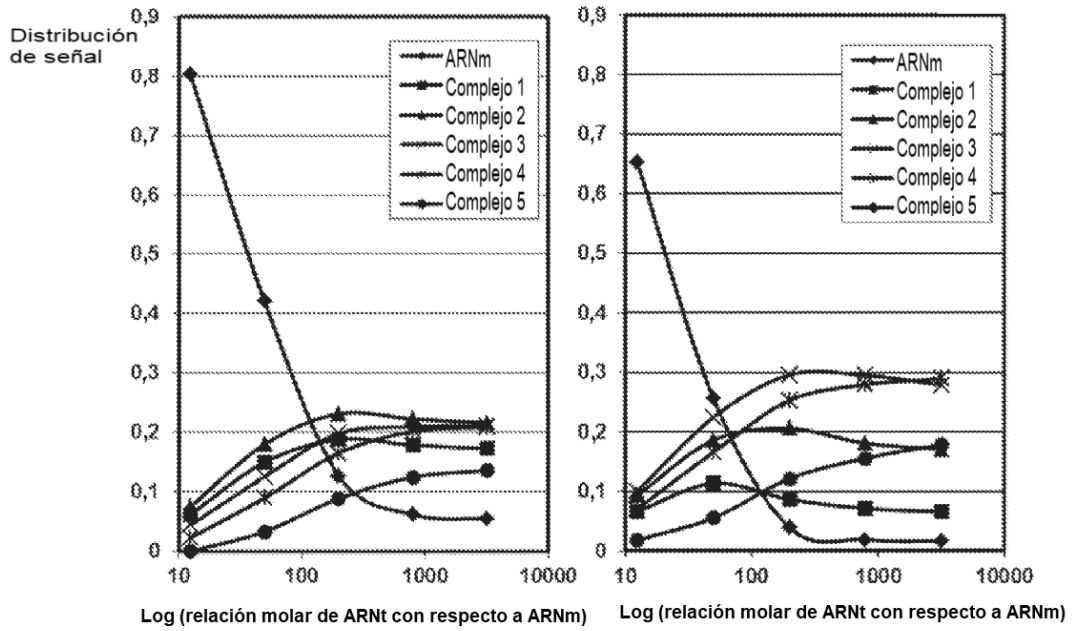


Fig. 34C

Fig. 34D

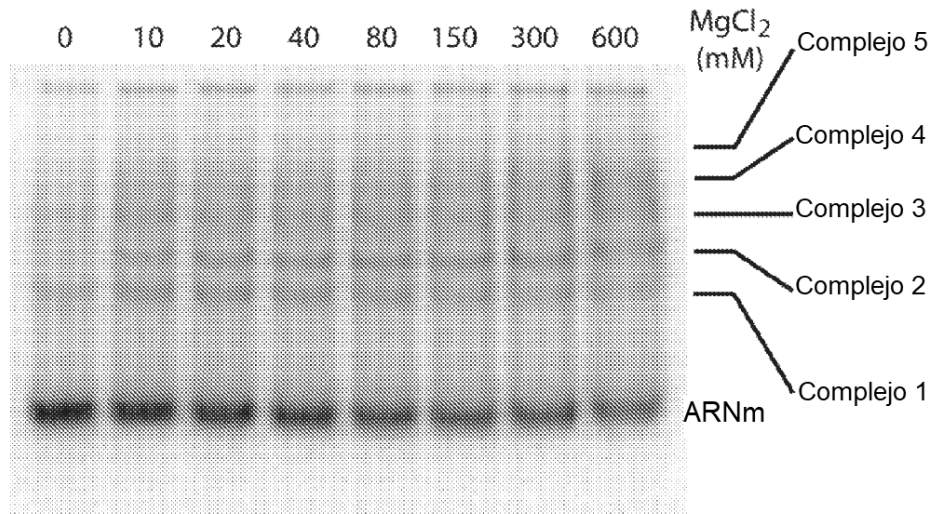


Fig. 35A

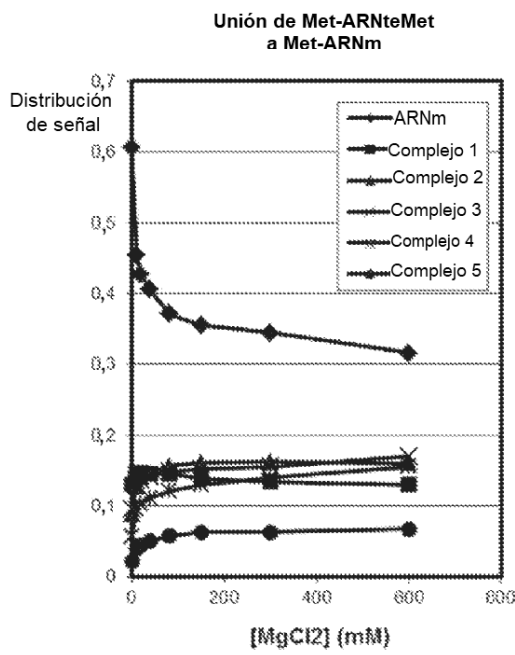


Fig. 35B

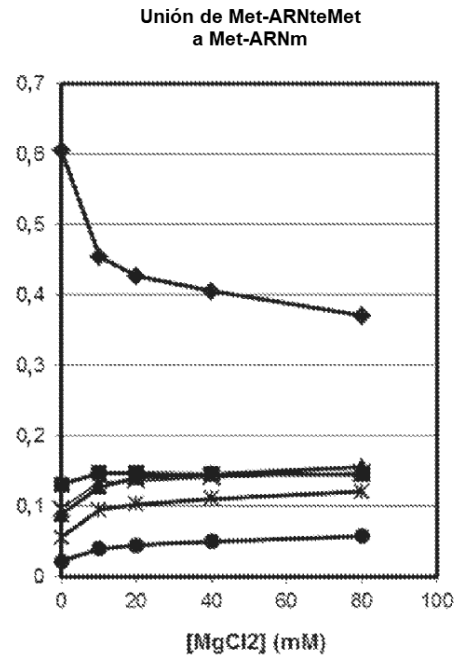


Fig. 35C

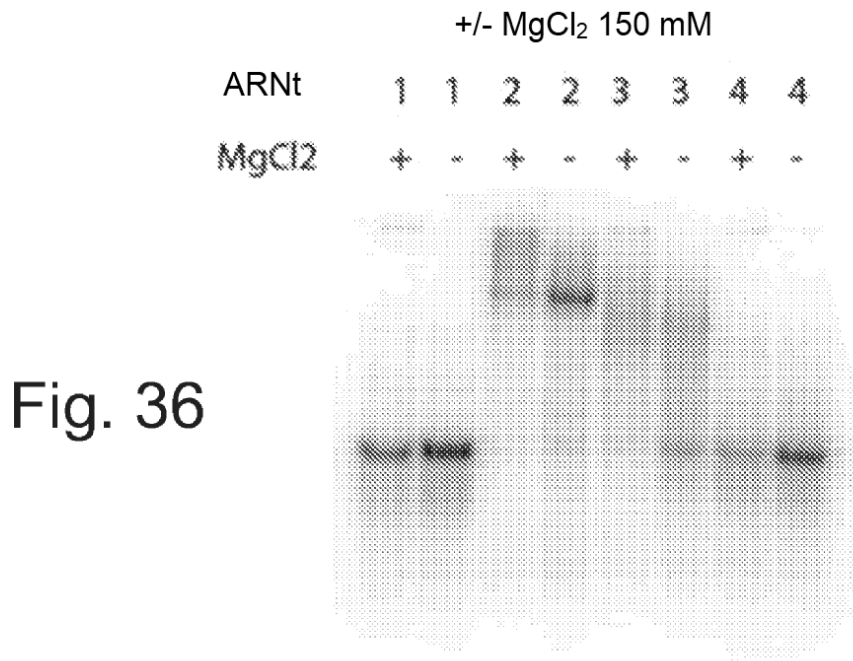


Fig. 36

Estado de ARNt  
 1 = sin ARNt  
 2 = ARNt<sup>eMet</sup>  
 3 = Met-ARNt<sup>eMet</sup>  
 4 = Cys-ARNt<sup>Cys</sup>

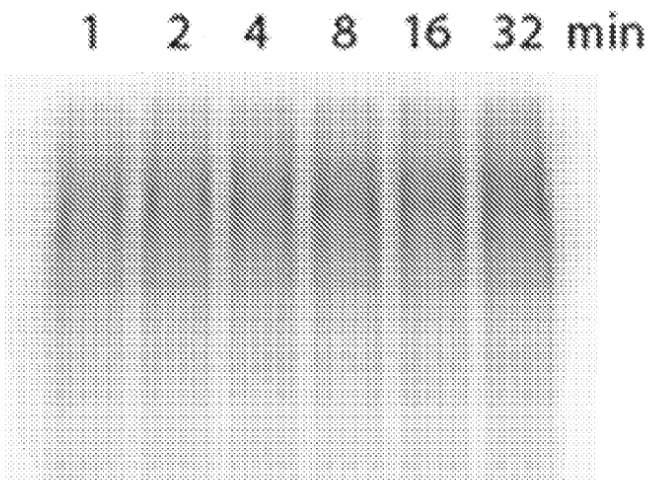


Fig. 37

Fig. 38A

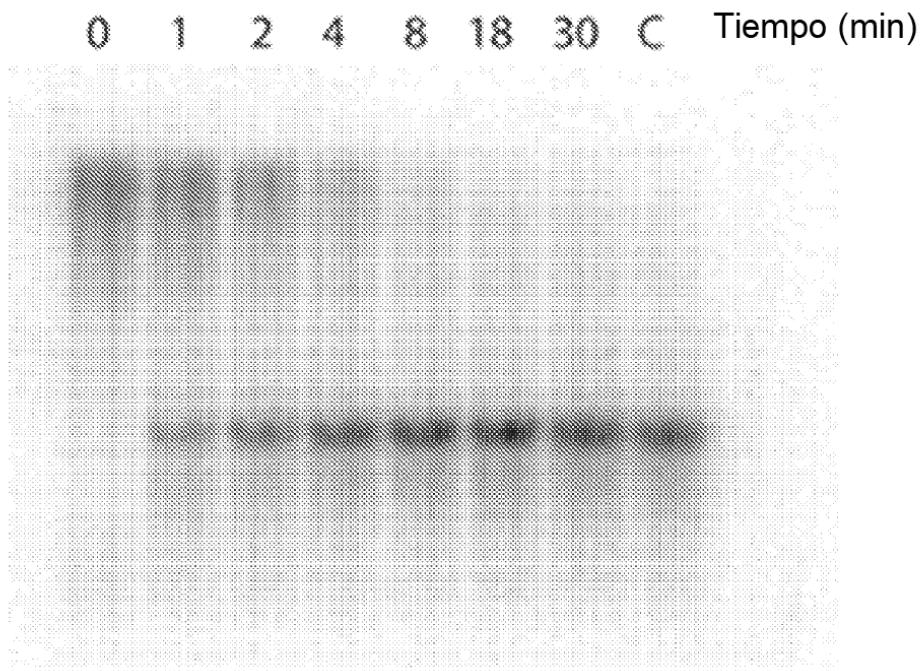
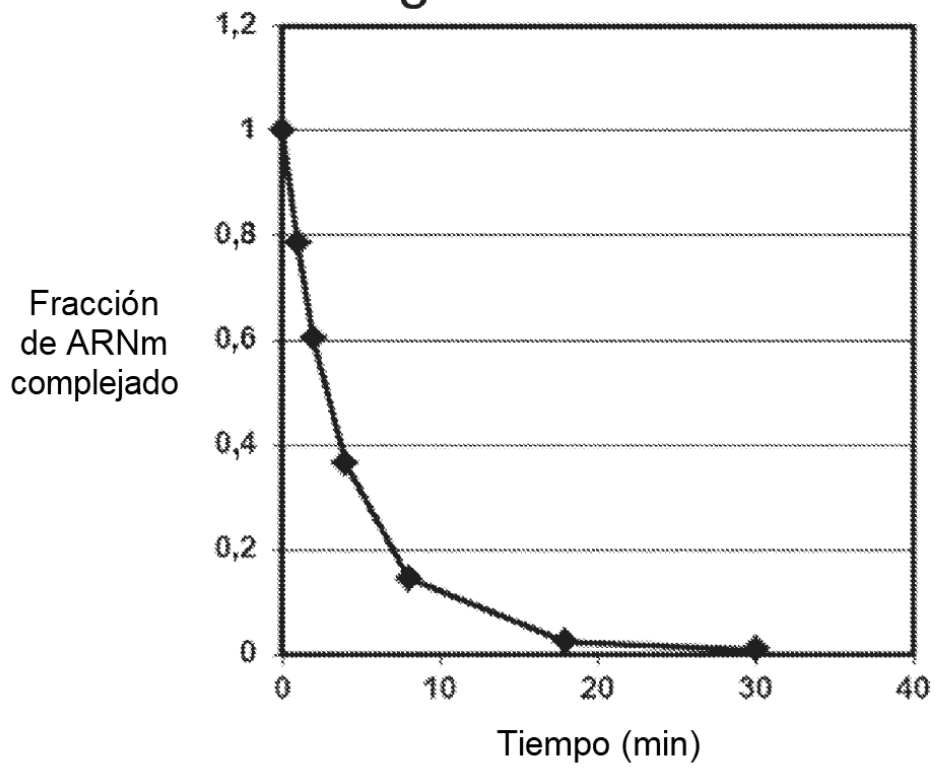


Fig. 38B





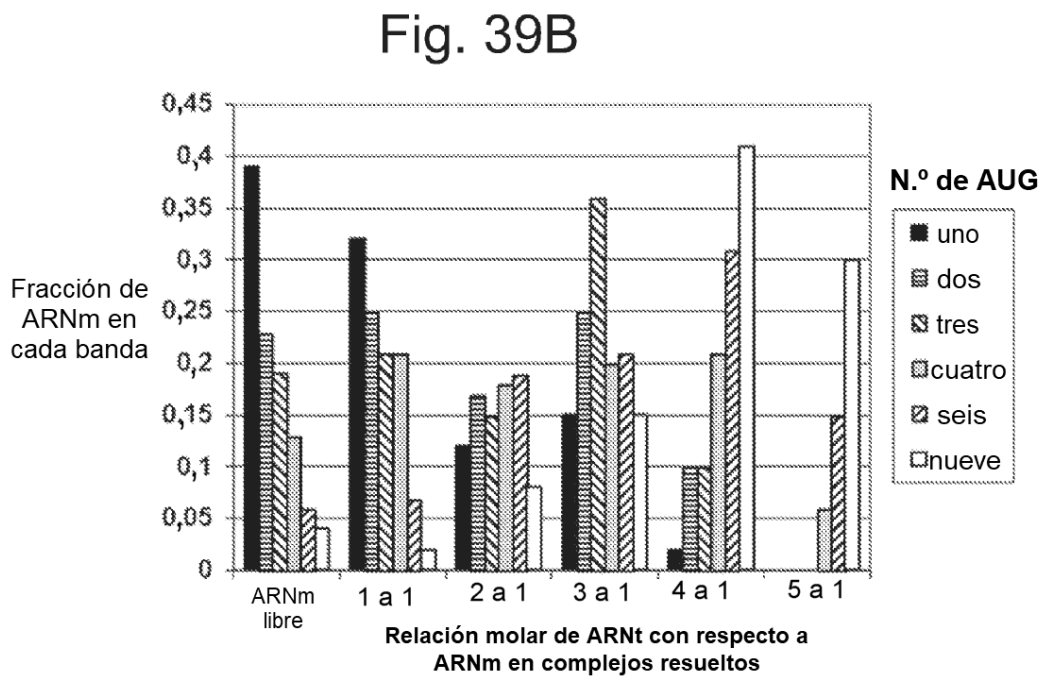
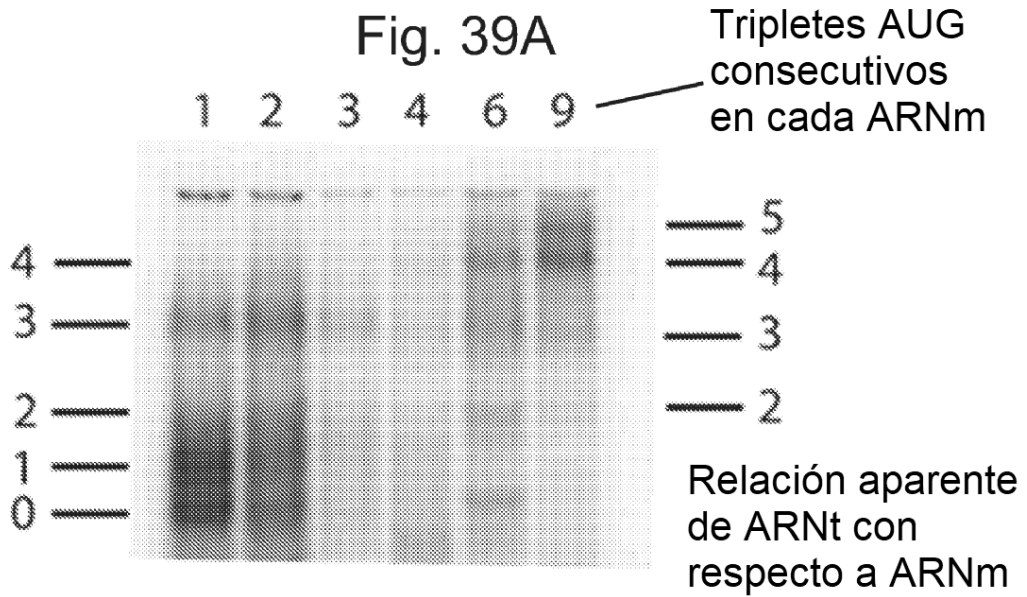


Fig. 40

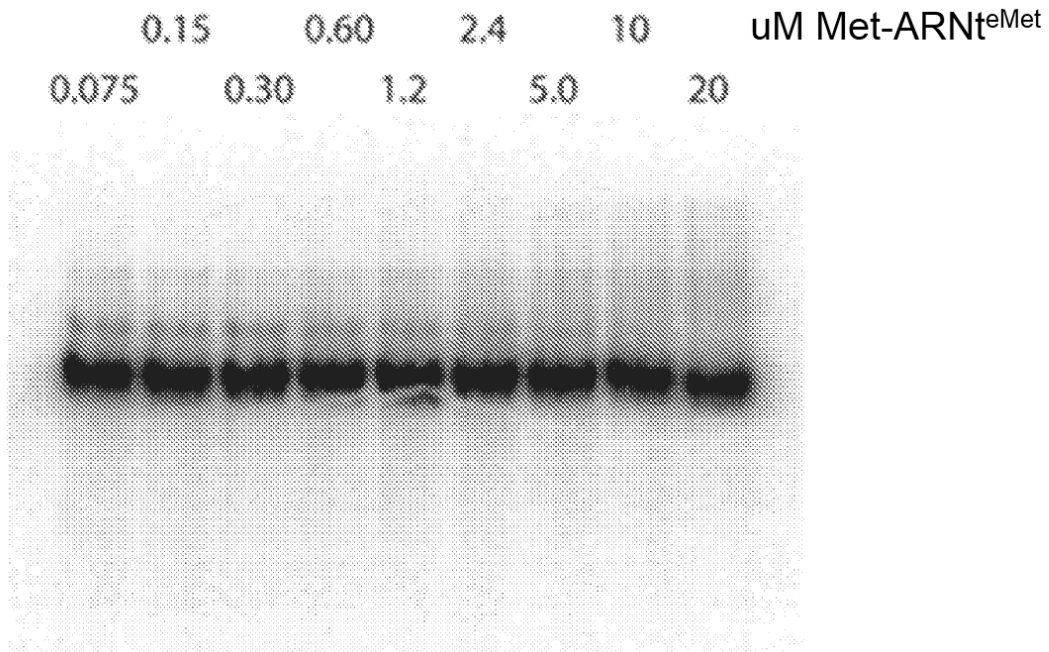


Fig. 41

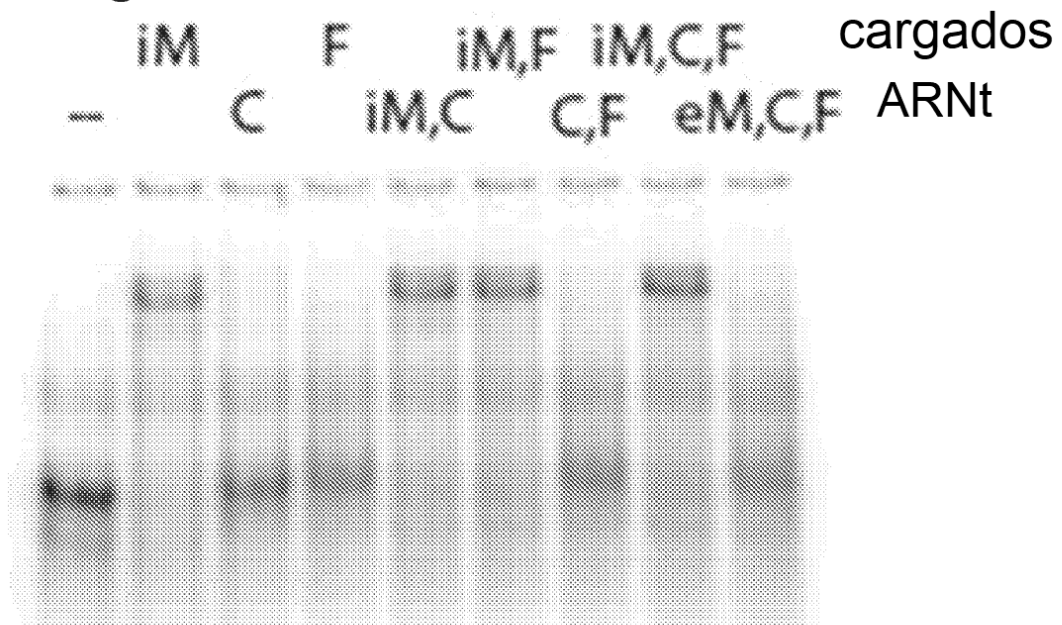


Fig. 42A

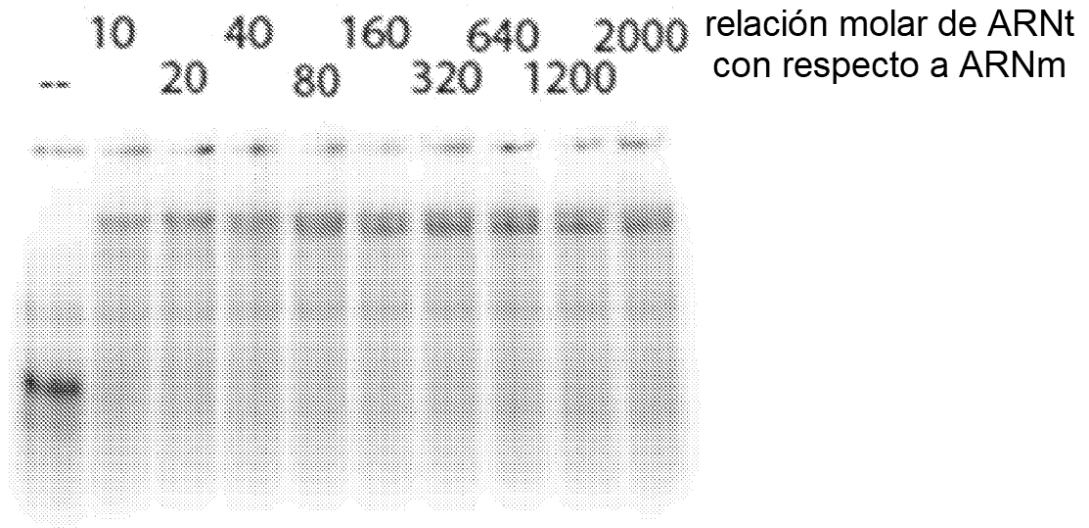


Fig. 42B

