



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 318 936**

② Número de solicitud: 200600248

⑤ Int. Cl.:
C07H 21/04 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **03.02.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2009**

Fecha de la concesión: **22.11.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **02.12.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
02.12.2010

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior Investigaciones Cientificas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Coll Capella, Miguel y
Aymami Bofarull, Juan**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Estructura cristalina de ADN y su utilización para la identificación de fármacos.**

㉒ Resumen:

Estructura cristalina de ADN y su utilización para la identificación de fármacos.

La estructura cristalina que comprende un entrecruzamiento de tres cadenas de ADN está caracterizada porque: pertenece al grupo espacial $P4(1)3_2$ y tiene unas dimensiones de celda $a=b=c=70,98 \pm 0,7\text{Å}$; todos los nucleótidos que constituyen dichas cadenas de ADN se encuentran emparejados; y dicho entrecruzamiento de tres cadenas de ADN alberga, en una cavidad hidrofóbica, una molécula. La estructura cristalina de la invención es una diana adecuada para el diseño de fármacos anti-ADN con una elevada especificidad.

ES 2 318 936 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Estructura cristalina de ADN y su utilización para la identificación de fármacos.

5 Esta invención se relaciona con el campo de la biomedicina en general y específicamente con la investigación farmacológica y la biología molecular. En particular, la presente invención se refiere a una estructura cristalina de ADN del tipo de entrecruzamiento de tres cadenas y a su utilización en un procedimiento para la identificación de una molécula candidata a fármaco.

10 **Estado de la técnica anterior**

Los entrecruzamientos helicoidales son importantes elementos estructurales en los ácidos nucleicos. En el ADN son intermedios de los acontecimientos de recombinación genética homóloga y en el ARN son importantes elementos estructurales.

15 Los entrecruzamientos de ADN son estructuras ramificadas únicas que consisten en varias hebras dobles o cadenas que convergen en un punto. El entrecruzamiento de ADN mejor caracterizado es el de cuatro cadenas, también conocido como unión Holliday (en inglés "*Holliday junction*"), un intermedio clave en la recombinación homóloga (cf. R. Holliday, "A mechanism for gene conversion in fungi", *Genet. Res.* 1964, vol. 5, pp. 282-304). Han sido resueltas las estructuras tridimensionales de entrecruzamientos de cuatro cadenas libres (cf. M. Ortiz-Lombardia *et al.*, "Crystal structure of a DNA Holliday junction", *Nat Struct Biol* 1999, vol. 6, pp. 913-7) y la de diferentes complejos con proteínas (cf. T. Biswas *et al.*, "A structural basis for allosteric control of DNA recombination by lambda integrase", *Nature* 2005, vol. 435, pp. 1059-66; S. M. Roe *et al.*, "Crystal structure of an octameric RuvA-Holliday junction complex", *Mol Cell* 1998, vol. 2, 361-72; D. N. Gopaul *et al.*, "Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site-specific recombination" 1998, *Embo J* vol. 17, pp. 4175-87; M.).

Los entrecruzamientos de tres cadenas, a pesar de ser las estructuras ramificadas de ácido nucleico más simples y más abundantes, no están bien caracterizadas. Los entrecruzamientos de tres cadenas se producen tanto en ARN como en ADN. En ARN se encuentran implicadas en funciones biológicas cruciales tales como el empalme (en inglés "splicing") (cf. C. Guthrie *et al.*, "Spliceosomal snRNAs", *Annu Rev Genet* 1988, vol. 22, pp. 387-419) y la traducción (cf. A. Nikulin *et al.*, "Crystal structure of the S15-rRNA complex", *Nat Struct Biol* 2000, vol. 7, pp. 273-7; B. T. Wimberly *et al.*, "Structure of the 30S ribosomal subunit", *Nature* 2000, vol. 407, pp. 327-39; N. Ban *et al.*, "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution", *Science* 2000, vol. 289, pp. 905-20). En ADN, los entrecruzamientos de tres cadenas se forman temporalmente durante la replicación del ADN (cf. M. R. Singleton *et al.*, "Structural analysis of DNA replication fork reversal by RecG", *Cell* 2001, vol. 107, pp. 79-89). Estas son estructuras intermedias formadas por expansiones de tripletes repetidos (cf. P. E. Pearson *et al.*, "Slipped-strand DNAs formed by long (CAG)ⁿ(CTG) repeats: slipped-out repeats and slip-out junctions", *Nucleic Acids Res* 2002, vol. 30, pp. 4534-47) debidas, en varios casos, a anomalías asociadas con varias enfermedades genéticas en humanos tales como la distrofia miotónica tipo 1 y la enfermedad de Huntington (cf. R. R. Sinden, "Neurodegenerative diseases. Origins of instability", *Nature* 2001, vol. 411, pp. 757-8).

Por otro lado, los ácidos nucleicos han sido, tradicionalmente, objeto de diferentes estudios relacionados con diversas enfermedades, especialmente en el campo del cáncer.

45 Los fármacos que interactúan con el ADN (también conocidos como fármacos anti-ADN) pueden unirse de manera covalente, como es el caso de los derivados de cis-Pt (de uso común en tratamientos anticancer), o de manera no covalente. Se conocen dos tipos principales de fármacos que interactúan de manera no covalente con el ADN, los agentes intercalantes de ADN y los agentes de unión a surco menor. En la actualidad, los agentes de unión a surco menor están siendo investigados como agentes antibacterianos o anticancer.

50 Por otro lado, los compuestos conocidos de manera colectiva como agentes intercalantes se pueden unir entre las bases de ADN, interrumpiendo la transcripción, replicación y/o las actividades de las topoisomerasas, induciendo la muerte de las células cancerígenas. Algunos de estos agentes intercalantes también se utilizan profusamente en clínica como fármacos anticancer.

55 A pesar de los muchos esfuerzos realizados para rediseñar la estructura química de los fármacos anti-ADN, estos resultan ser, en general, fármacos no específicos con amplios efectos citotóxicos.

60 Por tanto, existe la necesidad de nuevos agentes terapéuticos anti-ADN que sean altamente citotóxicos y específicos para el desarrollo de terapias alternativas a las ya existentes, así como procedimientos para la identificación de los mismos.

Explicación de la invención

65 Los inventores de la presente invención han caracterizado una nueva estructura cristalina de ADN del tipo entrecruzamiento de tres cadenas (en inglés "*3-way junction*" y de aquí en adelante también abreviada como "3WJ") que es capaz de complejarse con un fármaco.

ES 2 318 936 B1

Por lo tanto, en un primer aspecto la presente invención se refiere a una estructura cristalina que comprende un entrecruzamiento de tres cadenas de ADN, dicha estructura cristalina caracterizada porque: pertenece al grupo espacial P4(1)32 y tiene unas dimensiones de celda $a=b=c=70,98 \pm 0,7\text{\AA}$;

5 todos los nucleótidos que constituyen dichas cadenas de ADN se encuentran emparejados; y dicho entrecruzamiento de tres cadenas de ADN alberga, en una cavidad hidrofóbica, una molécula.

La estructura cristalina de la 3WJ de ADN de la presente invención tiene una conformación no apilada (forma de Y) y tiene una cavidad hidrofóbica trigonal central en la que la molécula o sustancia utilizada como candidato a fármaco -
10 helicato supramolecular $[\text{Fe}_2\text{L}_3]\text{Cl}_4^-$ encaja perfectamente, utilizando 9 de sus 12 anillos aromáticos para interactuar con el ADN. Los inventores de la presente invención han utilizado una molécula de helicato bien conocida para el experto en la materia (cf. M. J. Hannon *et al.*, "An inexpensive approach to supramolecular architecture", *Chemical Communications* 1997, pp. 1807-8) (Fig. 1a), para demostrar que la 3WJ de ADN es una estructura adecuada para que interactúen fármacos.

15 De esta manera, la estructura cristalina de acuerdo con el primer aspecto de la invención puede ser útil como diana estructuralmente bien definida para la búsqueda e identificación de nuevos fármacos citotóxicos altamente específicos.

Tal y como se ilustra en el ejemplo adjunto, con la estructura cristalina del primer aspecto de la invención se
20 consigue llevar a cabo una nueva aproximación para el reconocimiento del ADN y para el diseño de agentes que posean superficies moleculares complementarias a la 3WJ de ADN.

Los procedimientos generales de obtención de estructuras cristalinas que comprenden oligonucleótidos de ADN complejados o sin complejar con moléculas son bien conocidos por los expertos en la materia (cf. I. Berger *et al.* "A
25 highly efficient 24-condition matrix for the crystallization of nucleic acid fragments", *Acta Cryst. D* 1996, D52(3), pp. 465-8).

Uno de los posibles procedimientos para obtener dichas estructuras es el que se describe en el ejemplo adjunto.

30 La estructura del entrecruzamiento en el complejo con el helicato metalo-supramolecular $[\text{Fe}_2\text{L}_3]^{4+}$ (de geometría antiprisma trigonal) corresponde a un entrecruzamiento con forma de Y, no apilada, abierta. La estructura tiene simetría triple lo cual, en este caso, corresponde a una simetría cristalográfica favorecida por la naturaleza palindrómica de la secuencia oligonucleotídica utilizada (Figs. 1b y 2). Los tres brazos de la estructura son, por lo tanto, idénticos y no existe apilamiento coaxial hélice-a-hélice entre ellos. En cambio, el ángulo entre los brazos es de 110° , manteniéndose
35 en una disposición piramidal casi plana (Fig. 2).

La estructura de la presente invención difiere de otras conocidas en el estado de la técnica, analizadas mediante RMN, en que dos de los brazos están apilados de manera coaxial (cf. B. N. van Buuren *et al.*, "Solution structure of a
40 DNA three-way junction containing two unpaired thymidine bases. Identification of sequence features that decide conformation selection", *J Mol Biol* 2000, vol. 304, pp. 371-83; B. Wu *et al.*, "Global structure of a DNA three-way junction by solution NMR: towards prediction of 3H fold", *Nucleic Acids Res* 2004, vol. 32, pp. 3228-39). Sin embargo, en las publicaciones indicadas, la secuencia de ADN utiliza bases desemparejadas, lo cual explica las marcadas diferencias con la estructura de la presente invención.

45 En particular, en la presente invención todas las bases se emparejan según la manera Watson-Crick y las unidades de azúcar del esqueleto están en conformación C2'-endo. Los parámetros helicoidales corresponden a un ADN de tipo B con un giro medio de 35° . Las bases TA en el punto de unión están, en una de sus caras, no apiladas con otras bases de ADN, dejando un gran túnel hidrofóbico triangular en donde se une la sustancia candidato a fármaco. Cada cadena del ADN presenta una desviación repentina de 60° en el segmento central T3-A4. Esta característica estructural genera
50 grandes deformaciones en la geometría del esqueleto de ADN, principalmente en el ángulo de torsión β del esqueleto y en los ángulos de torsión glicosídicos χ (Figs. 2 y 3b).

El entrecruzamiento de tipo 3WJ de la presente invención define dos lados o caras diferentes, un lado con un surco mayor (Fig. 2a) y un lado con un surco menor (Fig. 2b) donde convergen los tres surcos respectivos mayores o
55 menores. En los brazos, el surco menor es estrecho tal y como se ha observado en segmentos de ADN con secuencias de adenina (cf. M. Coll *et al.*, "A bifurcated hydrogen-bonded conformation in the d(A.T) base pairs of the DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) and its complex with distamycin", *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, vol. 84, pp. 8385-8389), con espacio sólo para la hidratación con una molécula de agua. El surco mayor tiene la estructura de un B-ADN de anchura regular.

60 Es interesante el hecho de que la estructura de la presente invención tenga una geometría completamente diferente de la del entrecruzamiento de cuatro brazos (cf. M. Ortiz-Lombardia *et al.*, "Crystal structure of a DNA Holliday junction", *Nat Struct Biol* 1999, vol. 6, pp. 913-7). Se encontró que dicho entrecruzamiento de cuatro brazos estaba apilado en forma de X, es decir, con los brazos coaxialmente apilados por parejas en dos hélices continuas rotadas 45° , y con una pequeña estructura compacta en el punto de cruce. A diferencia de la estructura de la presente invención,
65 dicho entrecruzamiento de cuatro brazos no deja espacio o cabida para la unión del ligando, excepto por los surcos de ADN. Por tanto la estructura de tipo 3WJ de la presente invención es única y, a diferencia del entrecruzamiento de cuatro brazos, define una cavidad apropiada para la unión de fármacos.

ES 2 318 936 B1

La presencia de únicamente tres hebras dobles restringe las posibles conformaciones de 3WJ cuando se compara con los entrecruzamientos de cuatro hebras.

5 La estructura de tipo 3WJ de la presente invención no se perturba de manera significativa por la unión del fármaco, sino que este encaja perfectamente dentro de la estructura.

Por otro lado, cabe destacar el hecho de que los inventores de la presente invención han obtenido cristales complejos con oligonucleótidos que difieren en longitud (6, 8, 10 y 12 metros) y en secuencia.

10 De hecho, los resultados del ejemplo incluido en el presente documento sugieren que $[\text{Fe}_2\text{L}_3]^{4+}$ se une de manera selectiva a entrecruzamientos de 3 cadenas hexonucleotídicas de ADN, en donde la secuencia central es TA ó AT.

Por tanto, en una realización particular del primer aspecto de la invención, la estructura cristalina se caracteriza porque cada una de las cadenas de ADN comprende en la región central de cada cadena un dinucleótido seleccionado de entre TA y AT.

En otra realización del primer aspecto de la invención, las cadenas de ADN son hexanucleótidos.

20 En todavía otra realización, las cadenas de ADN tienen secuencias nucleotídicas iguales o diferentes entre sí y se seleccionan del grupo que consiste en: CGATCG, GCATGC, CGTACG, GCTAGC, CCATGG, GGATCC, CCTAGG y GGTACC.

En todavía aún otra realización, las tres cadenas de ADN que constituyen el entrecruzamiento tienen la misma secuencia y corresponden a la secuencia nucleotídica CGTACG.

25 Preferiblemente, dicha estructura cristalina de ADN tiene las características que se muestran en de la Tabla 1 y las coordenadas atómicas tridimensionales de la Tabla 2 y que han sido depositadas en el Protein Data Base (www.resb.org/pdb) con el código 2ET0 (véase más abajo).

30 Como se ha mencionado más arriba y se ilustra en el ejemplo adjunto, el espacio central de 3WJ está ocupado por el compuesto supramolecular tetracatiónico $[\text{Fe}_2\text{L}_3]^{4+}$, formado por tres cadenas orgánicas rodeadas por dos iones de Fe^{2+} (Fig. 1a). Cada cadena consiste en dos unidades de piridilamina (que se unen a los centros metálicos) separados por un espaciador difenilmetano. La estructura del fármaco helicato no sufre ningún cambio conformacional significativo por la unión al ADN. Este helicato tiene características duales remarcables: por un lado tiene una elevada carga positiva debida a los dos iones de Fe^{2+} situados coaxialmente a ambos extremos del fármaco y, por otro lado, exhibe amplias superficies hidrofóbicas debido a la presencia de 12 anillos aromáticos. Ambas características son fuerzas directrices para la interacción (no covalente) del helicato con el ADN. En primer lugar, la interacción dipolo electrostática tiene lugar entre el antiprisma cargado positivamente y los fosfatos del ADN cargados negativamente (Fig. 3a). En segundo lugar, los anillos fenil y piridina de la forma helicato extienden las interacciones de tipo apilamiento- π con las bases timina y adenina en el entrecruzamiento. Considerando una cadena orgánica sencilla, un anillo fenil (B) se apila con T3, mientras que el otro anillo de fenilo (C) se apila con A4 (Fig. 3b). Debido a la simetría triple del fármaco que se empareja con la simetría triple de 3WJ, esta doble interacción de apilamiento se repite 3 veces. También, el giro entre los dos anillos de B y C del fármaco es exactamente de 60° , el cual coincide con la desviación de 60° en la cadena de ADN entre las bases T3 y A4, dando lugar a un perfecto apilamiento entre bases consecutivas y anillos de fenilo consecutivos.

45 Los tres anillos de piridina (D) en un extremo del fármaco se encuentran localizados en el lado del surco menor del entrecruzamiento y son girados 60° , otra vez, con respecto a los anillos de fenilo C. Esto les permite ocupar los surcos menores de ADN entre unidades de azúcar opuestas en el esqueleto del ADN, generándose una estructura sándwich, entre la A4 de una cadena y D5 de la cadena complementaria (Fig. 3c), donde el surco menor del ADN es particularmente estrecho, dando lugar a fuertes interacciones de Van der Waals entre el fármaco y el esqueleto azúcar-fosfato de ADN. En el otro extremo del prisma, los tres anillos de piridina (A) ocupan el surco mayor, alejándose del ADN y no interaccionando con este (Fig. 2c).

55 No existen enlaces de hidrógeno convencionales entre el fármaco y el ADN ya que la superficie externa del fármaco contiene únicamente unidades C-H. Sin embargo, se observan interacciones cortas $\text{C-H}\cdots\text{X}$ entre el C-H imino adyacente a los anillos D y el nitrógeno N3 de A4; los átomos de hidrógeno (putativos) se encuentran en la orientación adecuada para un enlace de hidrógeno $\text{C-H}\cdots\text{X}$.

60 En un segundo aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de una sustancia candidata a fármaco caracterizado porque comprende las etapas de: (a) obtener una estructura cristalina dejando crecer cristales a partir de gotas que comprenden la sustancia a ser identificada y secuencias nucleotídicas según las realizaciones preferidas del primer aspecto de la invención; y (b) determinar la estructura cristalina obtenida, de manera que si dicha estructura pertenece al grupo espacial P4(1)32, tiene unas dimensiones de celda $a=b=c=70,98 \pm 0,7\text{Å}$ y todos los nucleótidos de dicha secuencia de ADN se encuentran emparejados, es indicativo de que dicha sustancia es un candidato a fármaco anti-ADN.

La determinación de los parámetros estructurales de la estructura cristalina de ADN de tipo 3WJ con la sustancia candidata a fármaco proporciona una información que permite, en un primer estadio, saber si la interacción entre la sustancia candidata a fármaco y el ADN es apropiada. Esta información puede ser utilizada para el diseño de moléculas (p. ej. fármacos) mediante técnicas computacionales que identifiquen posibles ligandos de unión para la cavidad característica de dicha estructura cristalina. Además, esta información puede ser utilizada para la predicción de cambios estructurales en la sustancia con el fin de optimizar la interacción de dicha sustancia con el ADN y, en consecuencia, mejorar su actividad anti-ADN. Por ejemplo Green *et al.*, *J. of Medicinal Chemistry* 1994, vol. 37, pp. 1035-54, describe una aproximación iterativa para el diseño de ligandos en base a secuencias repetidas de modelación por ordenador, formación de complejos ADN-ligando y análisis de rayos X.

Como resultado de la determinación de la estructura tridimensional, se pueden utilizar técnicas computacionales más precisas para el diseño racional de fármacos. Por ejemplo, se pueden utilizar programas ligando-receptor (cf. Jones *et al.*, *Current Opinion in Biotechnology* 1995, vol. 6, pp. 652-6) que requieren de información precisa sobre coordenadas atómicas de la diana.

Las aproximaciones por fragmentos unidos para diseñar fármacos, también requieren información precisa sobre las coordenadas atómicas de la diana (ADN). La idea básica que hay detrás de estas aproximaciones es determinar (computacionalmente o experimentalmente) los puntos de unión de ligandos a una molécula diana y, a continuación, construir una estructura para conectar los ligandos de manera que sus posiciones de unión relativas llevan a un compuesto que se puede perfeccionar adicionalmente utilizando, p. ej. la técnica iterativa de Green *et al. supra*. Para aproximaciones virtuales de fragmentos unidos véase Verlinde *et al.*, *J. of Computer Aided Molecular Design* 1992, vol. 6, pp. 131-47 y para las aproximaciones por RMN y RX véase Shucker *et al.*, *Science* 1996, vol. 274, pp. 1531-4 y Scout *et al.*, *Structure* 1998, vol. 6, pp. 839-48. La utilización de estas aproximaciones se hace posible gracias a la determinación de la estructura cristalina según la presente invención.

Muchas de las técnicas y aproximaciones de diseños de fármacos basadas en la estructura descritas más arriba dependen del análisis por rayos X para poder identificar la posición de unión de un ligando en un complejo ADN-ligando. Una manera rápida es realizar un análisis cristalográfico de rayos X con el complejo, producir un mapa de densidad electrónico de diferencia de Fourier entre el ADN con ligando y sin ligando y asociar un determinado patrón de densidad electrónica residual con el ligando. Sin embargo, con el fin de producir el mapa de diferencias es necesario conocer de antemano la estructura cristalina del ácido nucleico. Por lo tanto, la determinación de la estructura cristalina del ADN, según el primer aspecto de la invención, permite que se puedan obtener mapas de densidad electrónica por diferencia de Fourier los cuales pueden ayudar enormemente en el proceso de diseñar el fármaco de manera racional y rápida.

Las aproximaciones descritas más arriba requieren de la identificación inicial de los posibles compuestos que puedan interactuar con una biomolécula diana (en este caso la estructura cristalina de ADN). Algunas veces estos compuestos se conocen p. ej., a partir de la literatura científica publicada. Sin embargo, cuando no están o cuando se quieren nuevos fármacos, una primera etapa del programa de diseño del fármaco puede implicar el uso de bases de datos (tales como al Cambridge Structural Database) con el objetivo para la identificación de compuestos que interaccionen con el sitio o sitios activos de la biomolécula diana. El criterio de selección para la identificación se puede basar en propiedades farmacocinéticas tales como la estabilidad metabólica y la toxicidad.

Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la que la invención pertenece. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, componentes o pasos. El resumen de la solicitud se incorpora aquí como referencia. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1. muestra los esquemas de (a), La estructura del helicato supramolecular tetracatiónico $[\text{Fe}_2\text{L}_3]^{4+}$ ($\text{L}=\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_4$), siendo representados los iones de Fe^{2+} como esferas (b), el entrecruzamiento de tres cadenas de la presente invención donde se muestra la secuencia de ADN (CGTACG) utilizada en el Ejemplo de más abajo.

La Fig. 2 muestra la estructura cristalina del complejo de la 3WJ de ADN con el helicato en el centro del entrecruzamiento, en tres vistas diferentes: (a) vista desde el lado del surco mayor del ADN. (b) vista desde el lado del surco menor (c) vista lateral.

La Fig. 3. muestra detalles de las interacciones entre el candidato a fármaco helicato y el ADN: (a) Vista de la estructura por el eje de simetría triple que muestra las interacciones electrostáticas hierro-fosfato en el lado del surco menor. (b) Interacciones de apilamiento (flechas dobles) entre los anillos fenilo B y C del fármaco y las bases centrales T3 y A4 del entrecruzamiento. La cadena de ADN muestra fuertes distorsiones en el punto de unión, las bases no se apilan, con un ángulo de torsión β del esqueleto inusual ($\text{O}5'(\text{T}3)-\text{C}5'(\text{T}3)$) de 78° y un ángulo de torsión glicosídico χ -150° en la timidina T3 ($\beta \sim 180^\circ$ y $\chi \sim -110^\circ$ en ADN tipo B regular). Además de las interacciones de apilamiento, se observan las interacciones de tipo $\text{C}-\text{H} \cdots \text{N}$: ($\text{C}(\text{D}) \cdots \text{N}3(\text{A}4) = 3,3 \text{ \AA}$). (c), Interacción del anillo fenilo terminal D

del fármaco con el surco menor estrecho de ADN, reminiscencia del surco menor que se une a fármacos. Los iones de hierro se representan como esferas.

Ejemplos

Ejemplo 1

Obtención y caracterización de la estructura cristalina de la invención y de su interacción con una sustancia

Cristalización y obtención de datos

La síntesis del helicato $[\text{Fe}_2\text{L}_3]\text{Cl}_4$ ($\text{L}=\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_4$) (Fig. 1a) se ha descrito en M. J. Hannon *et al.*, "An inexpensive approach to supramolecular architecture", *Chemical Communications* 1997, pp. 1807-1808.

Los cristales de la invención se hicieron crecer a temperatura ambiente a partir de gotas posadas (en inglés "sitting drops") que contenían 0,5 μl de una solución acuosa de $[\text{Fe}_2\text{L}_3]\text{Cl}_4$ 10 mM, 1 μl de d(CGTAACG) 3 mM y 1,5 μl de una solución en reserva que contenía acetato de magnesio 0,08 M, TrisCl 0,05 M, pH 8,5, y PEG 400 al 5%. Después de una semana, aparecieron unos cristales octaédricos púrpura opacos que medían 0,2 x 0,2 x 0,2 mm.

Para congelar los cristales, estos se introdujeron en una solución que contenía glicerol al 25%. Se llevó a cabo un experimento MAD (difracción de múltiples longitudes de onda) cerca del canto de de absorción Fe K en la European Synchrotron Radiation Facility, ESRF, línea de luz: BM16 (Grenoble). Además, se recogieron los datos de alta resolución en la línea de luz ID14-EH2.

Todos los datos se indexaron y se integraron mediante el programa XDS^a (cf. W. Kabsch, "Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants", *J. Appl. Cryst.* 1993, vol. 26, pp. 795-800) y se escalaron y combinaron con el programa XSCALE (Tabla 1).

Determinación y refinado de la estructura

Se localizaron seis átomos de Fe utilizando el programa SHELXD (cf. G. Hedrick *et al.* "International Tables for Crystallography F", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 2001, pp. 333-351) a partir de los diferentes datos anómalos. Las fases iniciales MAD obtenidas mediante la construcción de Harker y la modificación de densidad con SHELXE (cf. G. Sheldrick, "Macromolecular phasing with SHELXE", *Z. Krist.* 2002, vol. 217, 644-650) permitió calcular un mapa experimental de resolución de 2,6 Å en donde se podía interpretar fácilmente un complejo fármaco-ADN.

Se localizó un segundo complejo en el segundo eje, perpendicular al eje del helicato, y, por lo tanto, desordenado en dos orientaciones opuestas. El primer complejo se construyó utilizando el programa gráfico X-VIEW (cf. D. E. McRee, "XtalView/Xfit--A versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density", *J Struct Biol* 1999, vol. 125, pp. 156-165). Una vez completado, este complejo se utilizó para construir el segundo complejo desordenado en dos orientaciones alternativas. Esto se realizó mediante superposición de iones metálicos, los cuales habían sido localizados claramente.

El refinamiento de la estructura siguió con SHELXL97 (Sheldrick, G. & Schneider, T. *Methods in Enzymology* 277 (eds. Carter Jr., C. & Sweet, R.) 319- 343 (Elsevier, 1997)), con restricciones del complejo desordenado respecto al complejo ordenado y con una ocupación mitad.

Se aplicó la corrección solvente y se refinaron los factores de temperatura isotrópicos. Se utilizó el programa gráfico TURBO-FRODO (cf. A. Roussel *et al.*, "In Silicon Graphics geometry partners directory 77-79", Silicon Graphics, Mountain View, CA, 1989) para construir un modelo y para la introducción de moléculas de agua. La Tabla 1 muestra las estadísticas de toma de datos, resolución de la estructura, refinamiento y modelo final, en donde:

^aSe tomaron los valores de pico de absorción como referencia.

^bLos valores entre paréntesis corresponden a la última capa de resolución.

$$^cR_{\text{sigma}} = (\sum[\sigma(F_o^2)] / \sum[F_o^2]) \times 100.$$

^dLa varianza V de densidad en una superficie esférica de radio 2,42 Å se calcula para cada píxel en el mapa y los píxeles con las varianzas más altas se consideran más probablemente ser posiciones atómicas. La conectividad es la fracción de píxeles adyacentes que se encuentran en el solvente o en la región macromolecular.

^eContraste = La varianza V respecto todos los píxeles.

^fCC:CC (véase (g)) pseudo libre calculado con el 10% de las reflexiones omitidas al azar después de realizar un ciclo de modificación de densidad.

ES 2 318 936 B1

^gMapa CC = $[N\sum|E_H| |E_A| - \sum |E_H|\sum |E_A|] / \{ [N\sum|E_H|^2 - (\sum|E_H|)^2] [N\sum|E_A|^2 - (\sum|E_A|)^2] \}^{1/2} \times 100$ siendo E_H los factores estructurales normalizados derivados de las posiciones atómicas del hierro y E_A de los datos de MAD F_A observados.

^h $R_{factor} = \{ \sum_{hkl} ||F_o| - k |F_c| / \sum_{hkl} |F_o| \} \times 100$, siendo F_o y F_c las amplitudes de factores estructurales observada y calculada; R_{factor} libre, idéntico al anterior pero para una serie de reflexiones no utilizadas durante el refinamiento.

ⁱPor unidad asimétrica.

Los datos obtenidos demuestran que la estructura cristalina de la presente invención es una diana adecuada para el diseño de una nueva familia de ligandos con una elevada especificidad estructural y fuerte unión.

Por tanto, la presente invención abre el camino para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos anti-ADN con características completamente nuevas.

TABLA 1

Estadísticas Cristalográficas

Recolección de datos:					
Conjunto de Datos	<u>Pico</u>	<u>Inflexión</u>	<u>Lejana</u>	<u>Alta Resolución</u>	
λ (Å) ^a	1,739	1,741	1,627	0,933	
Grupo espacial	P4 ₁ 32				
Parámetros de unidad de celda	a = b = c = 71.20 Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$				
Rango de Resolución (Å)	30-2,6	30-2,6	30-2,8	22,5-1,7	
Número de reflexiones:					
total	73.467	54.690	42.532	91.621	
únicas	3399	3407	2865	7.134	
Completitud (%) ^b	99,3 (97,8)	99,5 (98,3)	99,7 (100)	99,2 (99,7)	
$\langle I / \sigma(I) \rangle$ ^b	53,0 (11,4)	48,52 (9,3)	26,1 (5,5)	29,1 (8,8)	
Multiplicidad Promedio	21,61	16,1	14,8	12,8	
R_{σ} ^{c, b}	4,7 (24,3)	3,9 (26,6)	9,8 (55,1)	2,4 (11,8)	
Taseado:					
Conectividad ^d	0,90				
Contraste ^e	0,35				
CC pseudo libre ^f	62,9				
Mapa CC ^g	94				
Refinamiento:					
R_{factor} (R_{factor} libre) ^h	24,8 (27,5)				
Desviación cuadrática media respecto los valores diana					
Longitudes de enlace (Å)				0,008	
Distancias de ángulo de enlace (Å)				0,022	
Factores B promedio (Å ²)					
Fe ²⁺				16,6	
Fármaco				17,2	
ADN				22,0	
Solvente				40,0	
Número de Fe ²⁺ ⁱ				6	
Número de átomos en el fármaco ⁱ				149	
Número de átomo en el ADN ⁱ				243	
Número de moléculas de solvente ⁱ				40	

ES 2 318 936 B1

TABLA 2

Coordenadas atómicas tridimensionales de la estructura del complejo 3WJ de ADN y el helicato de formato PDB

5	ATOM	1	O5*	C A 11	44.330	22.196	9.303	1.00	38.41	O
	ATOM	2	C5*	C A 11	44.075	22.589	7.930	1.00	31.86	C
	ATOM	3	C4*	C A 11	42.566	22.621	7.737	1.00	28.31	C
10	ATOM	4	O4*	C A 11	42.133	23.831	8.349	1.00	25.39	O
	ATOM	5	C3*	C A 11	42.070	22.624	6.295	1.00	29.45	C
15	ATOM	6	O3*	C A 11	41.254	21.477	6.091	1.00	30.89	O
	ATOM	7	C2*	C A 11	41.325	23.927	6.131	1.00	29.09	C
	ATOM	8	C1*	C A 11	41.114	24.452	7.515	1.00	26.28	C
20	ATOM	9	N1	C A 11	41.347	25.875	7.814	1.00	23.28	N
	ATOM	10	C2	C A 11	40.231	26.656	8.193	1.00	20.88	C
25	ATOM	11	O2	C A 11	39.174	26.011	8.222	1.00	23.02	O
	ATOM	12	N3	C A 11	40.428	27.952	8.473	1.00	20.02	N
	ATOM	13	C4	C A 11	41.631	28.512	8.399	1.00	19.49	C
30	ATOM	14	N4	C A 11	41.789	29.806	8.681	1.00	24.41	N
	ATOM	15	C5	C A 11	42.799	27.752	8.013	1.00	20.55	C
35	ATOM	16	C6	C A 11	42.559	26.476	7.747	1.00	18.25	C
	ATOM	17	P	G A 12	40.761	20.973	4.658	1.00	36.81	P
40	ATOM	18	O1P	G A 12	40.325	19.563	4.612	1.00	34.44	O
	ATOM	19	O2P	G A 12	41.650	21.450	3.556	1.00	40.23	O
	ATOM	20	O5*	G A 12	39.401	21.861	4.507	1.00	36.05	O
45	ATOM	21	C5*	G A 12	38.281	21.546	5.339	1.00	30.63	C
	ATOM	22	C4*	G A 12	37.125	22.488	5.089	1.00	25.56	C
50	ATOM	23	O4*	G A 12	37.533	23.827	5.449	1.00	26.90	O
	ATOM	24	C3*	G A 12	36.639	22.579	3.648	1.00	27.58	C
	ATOM	25	O3*	G A 12	35.233	22.753	3.571	1.00	26.99	O
55	ATOM	26	C2*	G A 12	37.383	23.781	3.113	1.00	25.92	C
	ATOM	27	C1*	G A 12	37.320	24.691	4.322	1.00	25.50	C
60	ATOM	28	N9	G A 12	38.341	25.724	4.437	1.00	24.21	N
	ATOM	29	C8	G A 12	39.649	25.690	3.998	1.00	21.42	C
	ATOM	30	N7	G A 12	40.280	26.803	4.275	1.00	20.76	N
65	ATOM	31	C5	G A 12	39.362	27.614	4.924	1.00	23.76	C

ES 2 318 936 B1

TABLA 2 (continuación)

5	ATOM	32	C6	G A	12	39.448	28.919	5.460	1.00	23.02	C
	ATOM	33	O6	G A	12	40.393	29.730	5.504	1.00	28.21	O
	ATOM	34	N1	G A	12	38.252	29.358	6.038	1.00	21.96	N
10	ATOM	35	C2	G A	12	37.103	28.600	6.083	1.00	21.56	C
	ATOM	36	N2	G A	12	36.061	29.199	6.680	1.00	19.87	N
	ATOM	37	N3	G A	12	37.007	27.380	5.586	1.00	22.94	N
15	ATOM	38	C4	G A	12	38.149	26.945	5.028	1.00	23.10	C
	ATOM	39	P	T A	13	34.347	22.416	2.269	1.00	29.77	P
20	ATOM	40	O1P	T A	13	32.946	22.281	2.769	1.00	30.64	O
	ATOM	41	O2P	T A	13	34.946	21.328	1.461	1.00	29.58	O
	ATOM	42	O5*	T A	13	34.456	23.756	1.402	1.00	29.39	O
25	ATOM	43	C5*	T A	13	33.511	24.805	1.467	1.00	25.87	C
	ATOM	44	C4*	T A	13	33.635	25.693	2.669	1.00	22.50	C
	ATOM	45	O4*	T A	13	34.966	26.237	2.816	1.00	20.78	O
30	ATOM	46	C3*	T A	13	32.735	26.931	2.611	1.00	20.92	C
	ATOM	47	O3*	T A	13	32.283	27.309	3.895	1.00	18.88	O
35	ATOM	48	C2*	T A	13	33.639	27.976	1.959	1.00	19.24	C
	ATOM	49	C1*	T A	13	34.854	27.690	2.809	1.00	18.41	C
40	ATOM	50	N1	T A	13	36.204	28.120	2.398	1.00	16.10	N
	ATOM	51	C2	T A	13	36.604	29.353	2.873	1.00	16.41	C
	ATOM	52	O2	T A	13	35.900	30.059	3.578	1.00	20.19	O
45	ATOM	53	N3	T A	13	37.861	29.720	2.484	1.00	15.36	N
	ATOM	54	C4	T A	13	38.721	28.991	1.701	1.00	16.26	C
	ATOM	55	O4	T A	13	39.831	29.452	1.423	1.00	18.06	O
50	ATOM	56	C5	T A	13	38.237	27.719	1.246	1.00	16.30	C
	ATOM	57	C5M	T A	13	39.162	26.904	0.384	1.00	19.28	C
55	ATOM	58	C6	T A	13	37.013	27.333	1.608	1.00	15.37	C
	ATOM	59	P	A A	14	30.776	27.817	4.142	1.00	22.41	P
	ATOM	60	O1P	A A	14	30.504	27.901	5.586	1.00	22.42	O
60	ATOM	61	O2P	A A	14	29.860	27.082	3.194	1.00	20.84	O
	ATOM	62	O5*	A A	14	30.763	29.303	3.568	1.00	22.10	O
65	ATOM	63	C5*	A A	14	31.315	30.353	4.360	1.00	19.54	C

ES 2 318 936 B1

TABLA 2 (continuación)

5	ATOM	64	C4*	A A	14	30.856	31.666	3.800	1.00	18.94	C
	ATOM	65	O4*	A A	14	31.350	31.858	2.452	1.00	21.49	O
	ATOM	66	C3*	A A	14	29.336	31.811	3.677	1.00	20.93	C
10	ATOM	67	O3*	A A	14	29.057	33.146	4.040	1.00	22.19	O
	ATOM	68	C2*	A A	14	29.038	31.443	2.254	1.00	18.96	C
	ATOM	69	C1*	A A	14	30.237	31.986	1.515	1.00	18.07	C
15	ATOM	70	N9	A A	14	30.837	31.302	0.371	1.00	15.29	N
	ATOM	71	C8	A A	14	31.210	29.985	0.314	1.00	17.04	C
20	ATOM	72	N7	A A	14	31.732	29.617	-0.828	1.00	16.68	N
	ATOM	73	C5	A A	14	31.703	30.790	-1.588	1.00	14.90	C
	ATOM	74	C6	A A	14	32.123	31.045	-2.899	1.00	16.21	C
25	ATOM	75	N6	A A	14	32.667	30.131	-3.713	1.00	18.43	N
	ATOM	76	N1	A A	14	31.961	32.314	-3.361	1.00	17.41	N
30	ATOM	77	C2	A A	14	31.417	33.212	-2.540	1.00	15.08	C
	ATOM	78	N3	A A	14	30.981	33.092	-1.286	1.00	14.60	N
	ATOM	79	C4	A A	14	31.158	31.822	-0.856	1.00	14.43	C
35	ATOM	80	P	C A	15	27.582	33.776	3.914	1.00	24.65	P
	ATOM	81	O1P	C A	15	27.502	34.824	4.979	1.00	24.61	O
40	ATOM	82	O2P	C A	15	26.581	32.678	3.877	1.00	21.14	O
	ATOM	83	O5*	C A	15	27.544	34.471	2.493	1.00	25.11	O
	ATOM	84	C5*	C A	15	28.468	35.557	2.288	1.00	25.68	C
45	ATOM	85	C4*	C A	15	28.039	36.346	1.079	1.00	23.58	C
	ATOM	86	O4*	C A	15	28.377	35.611	-0.110	1.00	25.20	O
	ATOM	87	C3*	C A	15	26.539	36.611	0.973	1.00	27.46	C
50	ATOM	88	O3*	C A	15	26.343	37.947	0.537	1.00	30.86	O
	ATOM	89	C2*	C A	15	26.056	35.550	0.006	1.00	19.40	C
55	ATOM	90	C1*	C A	15	27.223	35.417	-0.941	1.00	24.88	C
	ATOM	91	N1	C A	15	27.547	34.130	-1.564	1.00	21.53	N
	ATOM	92	C2	C A	15	28.010	34.081	-2.865	1.00	22.54	C
60	ATOM	93	O2	C A	15	28.146	35.146	-3.499	1.00	22.80	O
	ATOM	94	N3	C A	15	28.314	32.897	-3.445	1.00	24.50	N
65	ATOM	95	C4	C A	15	28.159	31.768	-2.737	1.00	22.31	C

ES 2 318 936 B1

TABLA 2 (continuación)

5	ATOM	96	N4	CA	15	28.474	30.645	-3.369	1.00	26.44	N
	ATOM	97	C5	CA	15	27.685	31.790	-1.410	1.00	22.06	C
	ATOM	98	C6	CA	15	27.393	32.962	-0.847	1.00	23.93	C
10	ATOM	99	P	GA	16	24.886	38.652	0.522	1.00	30.28	P
	ATOM	100	O1P	GA	16	25.071	40.018	1.071	1.00	31.28	O
	ATOM	101	O2P	GA	16	23.823	37.799	1.136	1.00	32.28	O
15	ATOM	102	O5*	GA	16	24.543	38.678	-1.057	1.00	25.71	O
	ATOM	103	C5*	GA	16	25.334	39.503	-1.890	1.00	26.26	C
20	ATOM	104	C4*	GA	16	25.037	39.395	-3.356	1.00	25.40	C
	ATOM	105	O4*	GA	16	25.443	38.083	-3.844	1.00	25.49	O
	ATOM	106	C3*	GA	16	23.564	39.546	-3.726	1.00	20.81	C
25	ATOM	107	O3*	GA	16	23.420	40.314	-4.910	1.00	21.55	O
	ATOM	108	C2*	GA	16	23.101	38.123	-3.899	1.00	20.71	C
30	ATOM	109	C1*	GA	16	24.325	37.448	-4.474	1.00	22.20	C
	ATOM	110	N9	GA	16	24.460	36.027	-4.181	1.00	18.02	N
	ATOM	111	C8	GA	16	24.151	35.361	-3.030	1.00	21.34	C
35	ATOM	112	N7	GA	16	24.396	34.078	-3.099	1.00	22.66	N
	ATOM	113	C5	GA	16	24.898	33.890	-4.376	1.00	19.05	C
40	ATOM	114	C6	GA	16	25.346	32.710	-5.043	1.00	20.19	C
	ATOM	115	O6	GA	16	25.377	31.558	-4.593	1.00	25.72	O
	ATOM	116	N1	GA	16	25.765	32.999	-6.316	1.00	19.88	N
45	ATOM	117	C2	GA	16	25.773	34.224	-6.910	1.00	18.98	C
	ATOM	118	N2	GA	16	26.222	34.305	-8.167	1.00	19.64	N
50	ATOM	119	N3	GA	16	25.361	35.344	-6.310	1.00	18.64	N
	ATOM	120	C4	GA	16	24.948	35.081	-5.065	1.00	17.19	C
	TER	121		GA	16						
55	ATOM	122	C5*A	CB	31	23.497	10.415	30.205	0.50	29.02	C
	ATOM	123	C4*A	CB	31	22.723	11.013	31.366	0.50	27.42	C
60	ATOM	124	O4*A	CB	31	23.665	11.678	32.242	0.50	26.99	O
	ATOM	125	C3*A	CB	31	21.665	12.059	31.023	0.50	28.55	C
	ATOM	126	O3*A	CB	31	20.516	11.932	31.852	0.50	32.14	O
65	ATOM	127	C2*A	CB	31	22.360	13.377	31.246	0.50	27.21	C

ES 2 318 936 B1

TABLA 2 (continuación)

5	ATOM	128	C1*A	C B	31	23.408	13.075	32.303	0.50	25.73	C
	ATOM	129	N1 A	C B	31	24.727	13.702	32.118	0.50	22.37	N
	ATOM	130	C2 A	C B	31	25.041	14.840	32.861	0.50	19.79	C
10	ATOM	131	O2 A	C B	31	24.178	15.267	33.648	0.50	23.00	O
	ATOM	132	N3 A	C B	31	26.247	15.413	32.691	0.50	19.14	N
	ATOM	133	C4 A	C B	31	27.129	14.905	31.830	0.50	19.31	C
15	ATOM	134	N4 A	C B	31	28.310	15.509	31.697	0.50	23.58	N
	ATOM	135	C5 A	C B	31	26.832	13.743	31.058	0.50	21.22	C
20	ATOM	136	C6 A	C B	31	25.631	13.181	31.234	0.50	20.20	C
	ATOM	137	P A	G B	32	19.014	12.296	31.468	0.50	34.30	P
	ATOM	138	O1PA	G B	32	18.115	11.748	32.539	0.50	35.87	O
25	ATOM	139	O2PA	G B	32	18.701	11.963	30.057	0.50	38.07	O
	ATOM	140	O5*A	G B	32	18.936	13.891	31.612	0.50	33.93	O
30	ATOM	141	C5*A	G B	32	18.668	14.454	32.897	0.50	30.10	C
	ATOM	142	C4*A	G B	32	18.793	15.955	32.852	0.50	28.12	C
	ATOM	143	O4*A	G B	32	20.155	16.290	32.461	0.50	27.51	O
35	ATOM	144	C3*A	G B	32	17.904	16.707	31.860	0.50	28.62	C
	ATOM	145	O3*A	G B	32	17.537	17.968	32.385	0.50	29.17	O
40	ATOM	146	C2*A	G B	32	18.784	16.788	30.635	0.50	27.47	C
	ATOM	147	C1*A	G B	32	20.125	17.092	31.280	0.50	26.59	C
	ATOM	148	N9 A	G B	32	21.321	16.746	30.525	0.50	23.71	N
45	ATOM	149	C8 A	G B	32	21.468	15.884	29.472	0.50	22.87	C
	ATOM	150	N7 A	G B	32	22.697	15.809	29.026	0.50	22.15	N
50	ATOM	151	C5 A	G B	32	23.409	16.684	29.842	0.50	22.78	C
	ATOM	152	C6 A	G B	32	24.782	17.042	29.860	0.50	22.24	C
	ATOM	153	O6 A	G B	32	25.688	16.635	29.117	0.50	26.10	O
55	ATOM	154	N1 A	G B	32	25.073	17.971	30.862	0.50	19.04	N
	ATOM	155	C2 A	G B	32	24.151	18.487	31.736	0.50	19.59	C
60	ATOM	156	N2 A	G B	32	24.604	19.373	32.640	0.50	17.65	N
	ATOM	157	N3 A	G B	32	22.866	18.161	31.730	0.50	21.67	N
	ATOM	158	C4 A	G B	32	22.572	17.268	30.770	0.50	22.70	C
65	ATOM	159	P A	T B	33	16.352	18.895	31.838	0.50	31.49	P

ES 2 318 936 B1

	ATOM	160	O1PA	T B	33	15.776	19.656	32.986	0.50	30.42	O	
	ATOM	161	O2PA	T B	33	15.403	18.129	30.978	0.50	30.35	O	
5		ATOM	162	O5*A	T B	33	17.101	19.919	30.872	0.50	29.10	O
	ATOM	163	C5*A	T B	33	17.516	21.218	31.247	0.50	24.89	C	
10		ATOM	164	C4*A	T B	33	18.806	21.260	32.023	0.50	22.97	C
	ATOM	165	O4*A	T B	33	19.843	20.431	31.431	0.50	20.80	O	
	ATOM	166	C3*A	T B	33	19.462	22.640	32.100	0.50	18.44	C	
15		ATOM	167	O3*A	T B	33	20.119	22.793	33.317	0.50	16.12	O
	ATOM	168	C2*A	T B	33	20.415	22.629	30.913	0.50	18.75	C	
20		ATOM	169	C1*A	T B	33	20.962	21.214	31.041	0.50	19.25	C
	ATOM	170	N1 A	T B	33	21.489	20.563	29.825	0.50	17.21	N	
25		ATOM	171	C2 A	T B	33	22.824	20.738	29.525	0.50	17.21	C
	ATOM	172	O2 A	T B	33	23.574	21.402	30.222	0.50	19.26	O	
	ATOM	173	N3 A	T B	33	23.240	20.104	28.385	0.50	16.88	N	
30		ATOM	174	C4 A	T B	33	22.484	19.329	27.526	0.50	16.87	C
	ATOM	175	O4 A	T B	33	22.997	18.819	26.531	0.50	17.35	O	
35		ATOM	176	C5 A	T B	33	21.090	19.190	27.902	0.50	15.99	C
	ATOM	177	C5MA	T B	33	20.202	18.371	27.027	0.50	17.65	C	
	ATOM	178	C6 A	T B	33	20.678	19.806	29.016	0.50	14.83	C	
40		ATOM	179	P A	A B	34	20.311	24.119	34.172	0.50	20.84	P
	ATOM	180	O1PA	A B	34	21.188	23.824	35.341	0.50	22.22	O	
45		ATOM	181	O2PA	A B	34	18.983	24.762	34.384	0.50	20.55	O
	ATOM	182	O5*A	A B	34	21.143	25.095	33.206	0.50	19.18	O	
	ATOM	183	C5*A	A B	34	22.557	24.908	33.112	0.50	19.15	C	
50		ATOM	184	C4*A	A B	34	23.185	26.097	32.436	0.50	19.69	C
	ATOM	185	O4*A	A B	34	22.754	26.181	31.062	0.50	19.00	O	
55		ATOM	186	C3*A	A B	34	22.830	27.457	33.046	0.50	20.62	C
	ATOM	187	O3*A	A B	34	23.979	28.289	32.833	0.50	21.71	O	
	ATOM	188	C2*A	A B	34	21.660	27.919	32.191	0.50	20.32	C	
60		ATOM	189	C1*A	A B	34	22.005	27.389	30.836	0.50	17.90	C
	ATOM	190	N9 A	A B	34	21.033	26.894	29.866	0.50	16.07	N	
65		ATOM	191	C8 A	A B	34	20.108	25.896	30.047	0.50	16.19	C
	ATOM	192	N7 A	A B	34	19.365	25.663	28.993	0.50	17.05	N	

ES 2 318 936 B1

TABLA 2 (continuación)

5	ATOM	193	C5 A A B	34	19.843	26.574	28.048	0.50	15.31	C
	ATOM	194	C6 A A B	34	19.459	26.822	26.723	0.50	16.10	C
	ATOM	195	N6 A A B	34	18.476	26.144	26.108	0.50	15.71	N
10	ATOM	196	N1 A A B	34	20.131	27.790	26.069	0.50	17.12	N
	ATOM	197	C2 A A B	34	21.106	28.450	26.701	0.50	14.87	C
	ATOM	198	N3 A A B	34	21.557	28.305	27.955	0.50	16.22	N
15	ATOM	199	C4 A A B	34	20.865	27.333	28.576	0.50	14.84	C
	ATOM	200	P A C B	35	24.075	29.715	33.564	0.50	21.10	P
20	ATOM	201	O1PA C B	35	25.493	30.042	33.858	0.50	20.32	O
	ATOM	202	O2PA C B	35	23.040	29.847	34.625	0.50	23.12	O
	ATOM	203	O5*A C B	35	23.592	30.698	32.373	0.50	21.20	O
25	ATOM	204	C5*A C B	35	24.438	30.818	31.227	0.50	22.73	C
	ATOM	205	C4*A C B	35	23.933	31.892	30.303	0.50	22.09	C
30	ATOM	206	O4*A C B	35	22.829	31.431	29.496	0.50	22.78	O
	ATOM	207	C3*A C B	35	23.415	33.157	31.005	0.50	23.81	C
	ATOM	208	O3*A C B	35	23.851	34.276	30.228	0.50	24.69	O
35	ATOM	209	C2*A C B	35	21.909	32.995	30.923	0.50	18.86	C
	ATOM	210	C1*A C B	35	21.758	32.393	29.539	0.50	21.90	C
40	ATOM	211	N1 A C B	35	20.559	31.581	29.271	0.50	21.99	N
	ATOM	212	C2 A C B	35	20.049	31.533	27.969	0.50	23.16	C
	ATOM	213	O2 A C B	35	20.622	32.179	27.075	0.50	24.04	O
45	ATOM	214	N3 A C B	35	18.948	30.783	27.705	0.50	22.07	N
	ATOM	215	C4 A C B	35	18.360	30.105	28.687	0.50	20.77	C
50	ATOM	216	N4 A C B	35	17.277	29.382	28.393	0.50	25.10	N
	ATOM	217	C5 A C B	35	18.858	30.135	30.022	0.50	22.30	C
	ATOM	218	C6 A C B	35	19.949	30.876	30.273	0.50	23.11	C
55	ATOM	219	P A G B	36	24.299	35.642	30.936	0.50	25.17	P
	ATOM	220	O1PA G B	36	25.768	35.649	31.202	0.50	27.97	O
60	ATOM	221	O2PA G B	36	23.346	35.966	32.022	0.50	25.08	O
	ATOM	222	O5*A G B	36	24.058	36.680	29.733	0.50	24.16	O
	ATOM	223	C5*A G B	36	24.785	36.552	28.508	0.50	23.54	C
65	ATOM	224	C4*A G B	36	24.097	37.279	27.377	0.50	24.02	C

ES 2 318 936 B1

	ATOM	225	O4*A	G B	36	22.860	36.619	27.005	0.50	23.11	O
5	ATOM	226	C3*A	G B	36	23.707	38.726	27.690	0.50	21.78	C
	ATOM	227	O3*A	G B	36	23.852	39.539	26.525	0.50	22.38	O
	ATOM	228	C2*A	G B	36	22.275	38.587	28.155	0.50	20.96	C
10	ATOM	229	C1*A	G B	36	21.732	37.425	27.364	0.50	22.21	C
	ATOM	230	N9 A	G B	36	20.807	36.534	28.062	0.50	19.21	N
15	ATOM	231	C8 A	G B	36	20.841	36.180	29.390	0.50	20.21	C
	ATOM	232	N7 A	G B	36	19.875	35.362	29.721	0.50	20.74	N
	ATOM	233	C5 A	G B	36	19.163	35.165	28.542	0.50	19.18	C
20	ATOM	234	C6 A	G B	36	18.013	34.381	28.271	0.50	19.18	C
	ATOM	235	O6 A	G B	36	17.344	33.663	29.030	0.50	23.04	O
25	ATOM	236	N1 A	G B	36	17.629	34.473	26.938	0.50	17.77	N
	ATOM	237	C2 A	G B	36	18.266	35.223	25.982	0.50	16.99	C
	ATOM	238	N2 A	G B	36	17.723	35.165	24.761	0.50	16.57	N
30	ATOM	239	N3 A	G B	36	19.336	35.955	26.226	0.50	17.69	N
	ATOM	240	C4 A	G B	36	19.729	35.883	27.512	0.50	16.75	C
35	TER	241		G B	36						
	HETATM	242	FE	FE2	4	23.251	33.116	-13.063	0.50	16.15	FE
	HETATM	243	FE	FE2	5	18.360	30.929	-2.943	0.50	16.76	FE
40	HETATM	244	FE	FE2	6	40.553	30.373	-5.101	0.33	20.46	FE
	HETATM	245	FE	FE2	7	34.042	37.158	1.558	0.33	15.56	FE
45	HETATM	246	FE	FE2	8	20.328	20.754	20.801	0.17	21.05	FE
	HETATM	247	FE	FE2	9	27.203	27.203	27.203	0.17	12.56	FE
	HETATM	248	N11	NPM	1	24.219	31.739	-14.131	0.50	18.31	N
50	HETATM	249	N12	NPM	1	22.076	31.573	-12.775	0.50	17.99	N
	HETATM	250	N13	NPM	1	17.421	32.115	-4.233	0.50	15.55	N
55	HETATM	251	N14	NPM	1	17.730	32.349	-1.718	0.50	17.80	N
	HETATM	252	C1A	NPM	1	25.338	31.856	-14.835	0.50	19.99	C
	HETATM	253	C1B	NPM	1	25.921	30.805	-15.540	0.50	18.76	C
60	HETATM	254	C1C	NPM	1	25.347	29.589	-15.552	0.50	17.15	C
	HETATM	255	C1D	NPM	1	24.170	29.448	-14.843	0.50	19.54	C
65	HETATM	256	C1E	NPM	1	23.660	30.518	-14.141	0.50	19.33	C
	HETATM	257	C1F	NPM	1	22.441	30.479	-13.351	0.50	20.47	C

ES 2 318 936 B1

TABLA 2 (continuación)

5	HETATM	258	C1G	NPM	1	20.850	31.503	-12.017	0.50	15.78	C
	HETATM	259	C1H	NPM	1	19.735	32.105	-12.569	0.50	14.85	C
	HETATM	260	C1I	NPM	1	18.546	32.086	-11.830	0.50	17.77	C
10	HETATM	261	C1J	NPM	1	18.449	31.400	-10.647	0.50	19.46	C
	HETATM	262	C1K	NPM	1	19.599	30.802	-10.116	0.50	20.40	C
15	HETATM	263	C1L	NPM	1	20.823	30.948	-10.770	0.50	17.38	C
	HETATM	264	C1M	NPM	1	17.158	31.330	-9.886	0.50	19.45	C
	HETATM	265	C1N	NPM	1	17.243	31.566	-8.400	0.50	17.83	C
20	HETATM	266	C1O	NPM	1	16.565	30.734	-7.538	0.50	17.26	C
	HETATM	267	C1P	NPM	1	16.586	30.930	-6.181	0.50	16.37	C
25	HETATM	268	C1Q	NPM	1	17.319	31.959	-5.678	0.50	14.50	C
	HETATM	269	C1R	NPM	1	18.019	32.756	-6.501	0.50	14.22	C
	HETATM	270	C1S	NPM	1	17.988	32.559	-7.855	0.50	13.64	C
30	HETATM	271	C1T	NPM	1	16.890	33.171	-3.747	0.50	16.73	C
	HETATM	272	C1U	NPM	1	17.008	33.350	-2.323	0.50	20.05	C
35	HETATM	273	C1V	NPM	1	16.460	34.427	-1.625	0.50	22.81	C
	HETATM	274	C1W	NPM	1	16.651	34.473	-0.260	0.50	23.96	C
	HETATM	275	C1X	NPM	1	17.371	33.449	0.329	0.50	22.42	C
40	HETATM	276	C1Y	NPM	1	17.888	32.414	-0.402	0.50	19.31	C
	HETATM	277	N11	NPM	2	22.149	33.642	-14.631	0.50	18.61	N
45	HETATM	278	N12	NPM	2	21.990	34.393	-12.178	0.50	14.55	N
	HETATM	279	N13	NPM	2	20.103	31.845	-3.014	0.50	13.12	N
	HETATM	280	N14	NPM	2	19.322	29.891	-1.521	0.50	16.38	N
50	HETATM	281	C1A	NPM	2	22.291	33.210	-15.888	0.50	18.54	C
	HETATM	282	C1B	NPM	2	21.450	33.654	-16.898	0.50	17.74	C
55	HETATM	283	C1C	NPM	2	20.441	34.566	-16.627	0.50	18.51	C
	HETATM	284	C1D	NPM	2	20.294	35.016	-15.302	0.50	18.19	C
	HETATM	285	C1E	NPM	2	21.156	34.547	-14.342	0.50	18.10	C
60	HETATM	286	C1F	NPM	2	21.110	34.921	-12.955	0.50	15.96	C
	HETATM	287	C1G	NPM	2	21.960	34.769	-10.799	0.50	13.86	C
	HETATM	288	C1H	NPM	2	22.972	35.566	-10.299	0.50	13.90	C
65	HETATM	289	C1I	NPM	2	22.960	35.907	-8.938	0.50	11.98	C

ES 2 318 936 B1

TABLA 2 (continuación)

	HETATM 290	C1J NPM	2	21.932	35.504	-8.119	0.50	12.33	C
5	HETATM 291	C1K NPM	2	20.952	34.671	-8.652	0.50	13.53	C
	HETATM 292	C1L NPM	2	20.912	34.386	-9.998	0.50	12.13	C
10	HETATM 293	C1M NPM	2	21.859	35.914	-6.666	0.50	13.99	C
	HETATM 294	C1N NPM	2	21.384	34.855	-5.690	0.50	14.89	C
	HETATM 295	C1O NPM	2	21.967	33.585	-5.707	0.50	15.36	C
15	HETATM 296	C1P NPM	2	21.545	32.614	-4.840	0.50	13.53	C
	HETATM 297	C1Q NPM	2	20.535	32.877	-3.917	0.50	12.52	C
20	HETATM 298	C1R NPM	2	19.979	34.151	-3.861	0.50	14.89	C
	HETATM 299	C1S NPM	2	20.382	35.114	-4.785	0.50	12.89	C
	HETATM 300	C1T NPM	2	20.958	31.407	-2.131	0.50	14.59	C
25	HETATM 301	C1U NPM	2	20.571	30.352	-1.237	0.50	16.31	C
	HETATM 302	C1V NPM	2	21.340	29.840	-0.185	0.50	18.98	C
30	HETATM 303	C1W NPM	2	20.816	28.831	0.604	0.50	18.76	C
	HETATM 304	C1X NPM	2	19.656	28.291	0.233	0.50	16.33	C
	HETATM 305	C1Y NPM	2	18.827	28.935	-0.702	0.50	17.43	C
35	HETATM 306	N11 NPM	3	24.566	34.498	-13.408	0.50	24.10	N
	HETATM 307	N12 NPM	3	24.422	32.761	-11.505	0.50	18.51	N
40	HETATM 308	N13 NPM	3	18.810	29.490	-4.216	0.50	12.34	N
	HETATM 309	N14 NPM	3	16.732	29.848	-2.745	0.50	17.15	N
	HETATM 310	C1A NPM	3	24.605	35.391	-14.417	0.50	24.37	C
45	HETATM 311	C1B NPM	3	25.611	36.305	-14.515	0.50	23.38	C
	HETATM 312	C1C NPM	3	26.609	36.342	-13.574	0.50	24.29	C
50	HETATM 313	C1D NPM	3	26.588	35.423	-12.523	0.50	20.82	C
	HETATM 314	C1E NPM	3	25.561	34.527	-12.471	0.50	22.02	C
	HETATM 315	C1F NPM	3	25.426	33.528	-11.432	0.50	19.55	C
55	HETATM 316	C1G NPM	3	24.228	31.771	-10.488	0.50	17.07	C
	HETATM 317	C1H NPM	3	24.499	30.425	-10.668	0.50	18.87	C
60	HETATM 318	C1I NPM	3	24.262	29.525	-9.647	0.50	14.98	C
	HETATM 319	C1J NPM	3	23.755	29.933	-8.426	0.50	13.23	C
	HETATM 320	C1K NPM	3	23.512	31.277	-8.246	0.50	14.12	C
65	HETATM 321	C1L NPM	3	23.695	32.209	-9.273	0.50	11.96	C

ES 2 318 936 B1

TABLA 2 (continuación)

	HETATM	322	C1M	NPM	3	23.646	28.943	-7.279	0.50	11.67	C
5	HETATM	323	C1N	NPM	3	22.368	29.075	-6.438	0.50	12.42	C
	HETATM	324	C1O	NPM	3	21.164	29.363	-7.084	0.50	11.79	C
10	HETATM	325	C1P	NPM	3	19.987	29.507	-6.330	0.50	12.04	C
	HETATM	326	C1Q	NPM	3	20.013	29.289	-4.971	0.50	13.71	C
	HETATM	327	C1R	NPM	3	21.212	29.026	-4.347	0.50	15.83	C
15	HETATM	328	C1S	NPM	3	22.385	28.920	-5.079	0.50	12.84	C
	HETATM	329	C1T	NPM	3	17.973	28.528	-4.236	0.50	13.90	C
20	HETATM	330	C1U	NPM	3	16.770	28.671	-3.458	0.50	16.47	C
	HETATM	331	C1V	NPM	3	15.758	27.765	-3.378	0.50	17.76	C
	HETATM	332	C1W	NPM	3	14.654	28.057	-2.587	0.50	19.02	C
25	HETATM	333	C1X	NPM	3	14.616	29.239	-1.924	0.50	18.75	C
	HETATM	334	C1Y	NPM	3	15.632	30.139	-2.016	0.50	18.39	C
30	HETATM	335	N11	NPM	10	42.383	29.795	-4.585	1.00	28.42	N
	HETATM	336	N12	NPM	10	40.245	29.970	-3.208	1.00	23.78	N
	HETATM	337	N13	NPM	10	33.279	35.702	0.440	1.00	14.30	N
35	HETATM	338	N14	NPM	10	32.483	38.126	0.812	1.00	15.78	N
	HETATM	339	C1A	NPM	10	43.463	29.721	-5.356	1.00	28.62	C
40	HETATM	340	C1B	NPM	10	44.697	29.299	-4.862	1.00	30.21	C
	HETATM	341	C1C	NPM	10	44.827	28.943	-3.577	1.00	31.98	C
	HETATM	342	C1D	NPM	10	43.712	28.999	-2.760	1.00	29.58	C
45	HETATM	343	C1E	NPM	10	42.524	29.442	-3.297	1.00	27.80	C
	HETATM	344	C1F	NPM	10	41.271	29.558	-2.553	1.00	25.67	C
50	HETATM	345	C1G	NPM	10	38.988	30.090	-2.495	1.00	20.67	C
	HETATM	346	C1H	NPM	10	37.970	29.199	-2.809	1.00	19.03	C
	HETATM	347	C1I	NPM	10	36.768	29.367	-2.114	1.00	16.82	C
55	HETATM	348	C1J	NPM	10	36.553	30.322	-1.161	1.00	16.47	C
	HETATM	349	C1K	NPM	10	37.623	31.180	-0.850	1.00	16.03	C
60	HETATM	350	C1L	NPM	10	38.818	31.038	-1.531	1.00	15.92	C
	HETATM	351	C1M	NPM	10	35.266	30.421	-0.406	1.00	12.86	C
	HETATM	352	C1N	NPM	10	34.738	31.815	-0.172	1.00	13.12	C
65	HETATM	353	C1O	NPM	10	34.208	32.188	1.021	1.00	15.77	C

ES 2 318 936 B1

TABLA 2 (continuación)

	HETATM	354	C1P	NPM	10	33.758	33.459	1.296	1.00	17.08	C
5	HETATM	355	C1Q	NPM	10	33.780	34.353	0.266	1.00	15.94	C
	HETATM	356	C1R	NPM	10	34.320	34.013	-0.930	1.00	15.86	C
10	HETATM	357	C1S	NPM	10	34.749	32.735	-1.187	1.00	16.41	C
	HETATM	358	C1T	NPM	10	32.213	36.018	-0.208	1.00	14.47	C
	HETATM	359	C1U	NPM	10	31.721	37.358	-0.039	1.00	14.02	C
15	HETATM	360	C1V	NPM	10	30.565	37.837	-0.673	1.00	16.56	C
	HETATM	361	C1W	NPM	10	30.215	39.163	-0.472	1.00	20.32	C
20	HETATM	362	C1X	NPM	10	30.989	39.917	0.404	1.00	19.26	C
	HETATM	363	C1Y	NPM	10	32.094	39.372	1.024	1.00	17.69	C
	HETATM	364	N11	NPM	30	20.870	18.915	20.282	0.50	28.55	N
25	HETATM	365	N12	NPM	30	21.087	20.145	22.507	0.50	22.43	N
	HETATM	366	N13	NPM	30	25.228	27.410	27.285	0.50	13.08	N
30	HETATM	367	N14	NPM	30	27.093	29.179	27.238	0.50	16.03	N
	HETATM	368	C1A	NPM	30	20.735	18.326	19.098	0.50	29.58	C
	HETATM	369	C1B	NPM	30	21.159	17.016	18.859	0.50	30.63	C
35	HETATM	370	C1C	NPM	30	21.731	16.310	19.843	0.50	31.24	C
	HETATM	371	C1D	NPM	30	21.883	16.906	21.076	0.50	30.39	C
40	HETATM	372	C1E	NPM	30	21.441	18.196	21.259	0.50	27.75	C
	HETATM	373	C1F	NPM	30	21.547	18.948	22.501	0.50	25.07	C
	HETATM	374	C1G	NPM	30	21.180	20.909	23.736	0.50	19.86	C
45	HETATM	375	C1H	NPM	30	20.012	21.353	24.311	0.50	18.61	C
	HETATM	376	C1I	NPM	30	20.074	22.063	25.512	0.50	16.94	C
50	HETATM	377	C1J	NPM	30	21.264	22.381	26.110	0.50	17.38	C
	HETATM	378	C1K	NPM	30	22.459	21.915	25.526	0.50	11.99	
	HETATM	379	C1L	NPM	30	22.383	21.170	24.346	0.50	16.45	C
55	HETATM	380	C1M	NPM	30	21.271	23.264	27.337	0.50	14.92	C
	HETATM	381	C1N	NPM	30	22.314	24.364	27.307	0.50	15.00	C
60	HETATM	382	C1O	NPM	30	23.105	24.610	28.390	0.50	17.56	C
	HETATM	383	C1P	NPM	30	24.087	25.579	28.389	0.50	18.04	C
	HETATM	384	C1Q	NPM	30	24.229	26.357	27.280	0.50	16.05	C
65	HETATM	385	C1R	NPM	30	23.449	26.135	26.206	0.50	15.27	C

ES 2 318 936 B1

TABLA 2 (continuación)

	HETATM	386	C1S	NPM	30	22.522	25.127	26.197	0.50	15.60	C
5	HETATM	387	C1T	NPM	30	24.813	28.617	27.251	0.50	14.12	C
	HETATM	388	C1U	NPM	30	25.809	29.661	27.228	0.50	14.58	C
	HETATM	389	C1V	NPM	30	25.515	31.024	27.184	0.50	17.26	C
10	HETATM	390	C1W	NPM	30	26.564	31.917	27.194	0.50	19.19	C
	HETATM	391	C1X	NPM	30	27.856	31.413	27.214	0.50	19.11	C
15	HETATM	392	C1Y	NPM	30	28.085	30.062	27.173	0.50	16.43	C
	HETATM	393	O	HOH	101	33.246	28.247	7.010	1.00	27.10	O
	HETATM	394	O	HOH	102	42.346	28.597	0.620	1.00	31.82	O
20	HETATM	395	O	HOH	103	34.693	25.622	6.505	1.00	26.94	O
	HETATM	396	O	HOH	104	28.373	38.380	-3.634	1.00	24.10	O
25	HETATM	397	O	HOH	105	32.271	26.930	-0.799	1.00	32.73	O
	HETATM	398	O	HOH	106	34.566	32.210	5.131	1.00	20.54	O
	HETATM	399	O	HOH	107	30.082	32.100	7.182	1.00	23.91	O
30	HETATM	400	O	HOH	108	26.196	29.351	4.619	1.00	47.40	O
	HETATM	401	O	HOH	109	29.054	34.682	7.348	1.00	26.03	O
35	HETATM	402	O	HOH	110	18.376	34.136	32.334	1.00	37.04	O
	HETATM	403	O	HOH	111	23.347	13.231	27.945	1.00	61.50	O
	HETATM	404	O	HOH	112	27.654	40.637	1.352	1.00	25.58	O
40	HETATM	405	O	HOH	113	43.117	29.418	4.069	1.00	39.36	O
	HETATM	406	O	HOH	114	45.056	32.754	-5.797	1.00	40.64	O
45	HETATM	407	O	HOH	115	30.214	14.885	30.437	1.00	30.89	O
	HETATM	408	O	HOH	116	21.861	35.961	-0.248	1.00	47.77	O
	HETATM	409	O	HOH	117	24.258	33.183	2.196	1.00	47.36	O
50	HETATM	410	O	HOH	118	33.138	23.668	6.230	1.00	34.86	O
	HETATM	411	O	HOH	119	29.896	25.594	7.089	1.00	39.13	O
55	HETATM	412	O	HOH	120	23.251	25.489	37.448	1.00	45.34	O
	HETATM	413	O	HOH	121	37.792	25.616	-3.248	1.00	42.72	O
	HETATM	414	O	HOH	122	46.255	20.316	9.980	1.00	29.06	O
60	HETATM	415	O	HOH	123	26.762	38.117	5.190	1.00	50.62	O
	HETATM	416	O	HOH	124	28.420	38.917	7.596	1.00	44.93	O
65	HETATM	417	O	HOH	125	19.636	14.311	26.966	1.00	49.30	O

ES 2 318 936 B1

TABLA 2 (continuación)

5	HETATM 418	O	HOH 126	33.704	27.440	-4.066	1.00	39.80	O
	HETATM 419	O	HOH 127	21.118	26.580	36.620	1.00	58.31	O
	HETATM 420	O	HOH 128	29.083	38.877	3.016	1.00	26.66	O
10	HETATM 421	O	HOH 129	23.476	32.351	-0.163	1.00	24.95	O
	HETATM 422	O	HOH 130	33.652	25.005	9.389	1.00	33.25	O
15	HETATM 423	O	HOH 131	36.369	24.926	-1.000	1.00	44.68	O
	HETATM 424	O	HOH 132	20.191	22.401	37.913	1.00	53.01	O
	HETATM 425	O	HOH 133	17.261	19.558	27.835	1.00	56.45	O
20	HETATM 426	O	HOH 134	12.512	21.136	30.880	1.00	47.39	O
	HETATM 427	O	HOH 135	42.463	25.915	3.299	1.00	54.47	O
25	HETATM 428	O	HOH 136	45.074	33.856	-10.124	1.00	52.40	O
	HETATM 429	O	HOH 137	15.767	25.425	26.037	1.00	49.56	O
	HETATM 430	O	HOH 138	19.611	24.415	39.582	1.00	58.18	O
30	HETATM 431	O	HOH 139	36.089	19.355	4.222	1.00	46.72	O
	HETATM 432	O	HOH 140	45.730	31.466	-7.778	1.00	41.08	O
35	HETATM 433	O	HOH 141	29.205	26.898	0.874	1.00	60.12	O
	HETATM 434	O	HOH 142	40.823	23.484	1.745	1.00	47.09	O
40	HETATM 435	O	HOH 143	33.439	28.096	9.651	1.00	51.49	O
	HETATM 436	O	HOH 145	27.195	33.804	-14.960	1.00	39.47	O
45	HETATM 437	O	HOH 146	39.884	18.968	6.154	1.00	53.82	O
	END								

50

55

60

65

ES 2 318 936 B1

REIVINDICACIONES

5 1. Estructura cristalina que comprende un entrecruzamiento de tres cadenas de ADN, dicha estructura cristalina **caracterizada** porque:

a) pertenece al grupo espacial P4(1)32 y tiene unas dimensiones de celda $a=b=c=70,98 \pm 0,7\text{\AA}$;

10 b) dichas cadenas de ADN son hexanucleótidos cuyas secuencias nucleotídicas, iguales o diferentes entre sí, se seleccionan del grupo que consiste en CGATCG, GCATGC, CGTACG, GCTAGC, CCATGG, GGATCC, CCTAGG y GGTACC, en los que todos los nucleótidos se encuentran emparejados; y

c) el entrecruzamiento de las tres cadenas de ADN alberga, en una cavidad hidrofóbica, una molécula.

15 2. Estructura cristalina según la reivindicación 1 **caracterizada** porque las tres cadenas de ADN tienen la misma secuencia nucleotídica y ésta es CGTACG.

20 3. Estructura cristalina según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizada** porque tiene las coordenadas atómicas dimensionales de la Tabla 1.

4. Estructura cristalina según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizada** por el hecho de que la molécula es un candidato a fármaco anti-ADN.

25 5. Procedimiento de identificación de una sustancia candidata a fármaco **caracterizado** porque comprende las etapas de:

a) obtener una estructura cristalina dejando crecer, a temperatura ambiente, gotas posadas que comprenden la sustancia a ser identificada y las secuencias nucleotídicas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2; y

30 b) determinar los parámetros de la estructura cristalina obtenida de manera que si dicha estructura pertenece al grupo espacial P4(1)32, tiene unas dimensiones de celda $a=b=c=70,98 \pm 0,7\text{\AA}$ y todos los nucleótidos de las secuencias nucleotídicas de ADN se encuentran emparejados, es indicativo de que dicha sustancia es un candidato a fármaco anti-ADN.

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

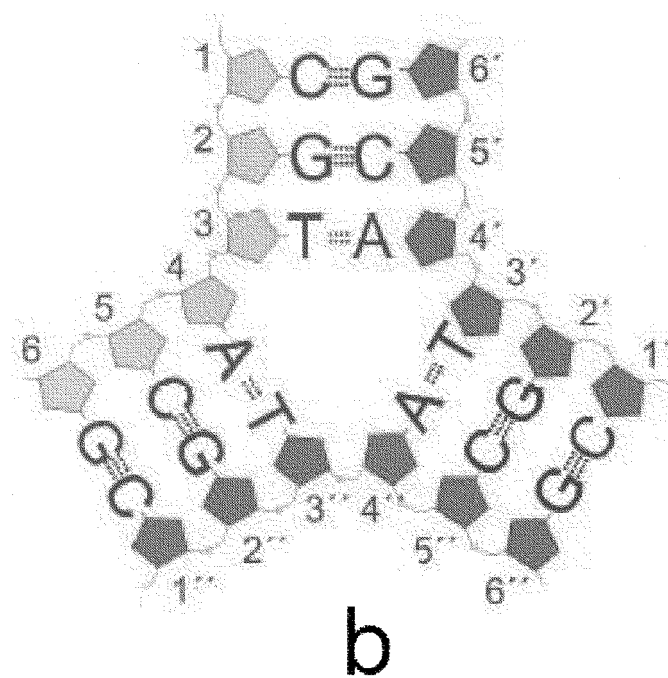
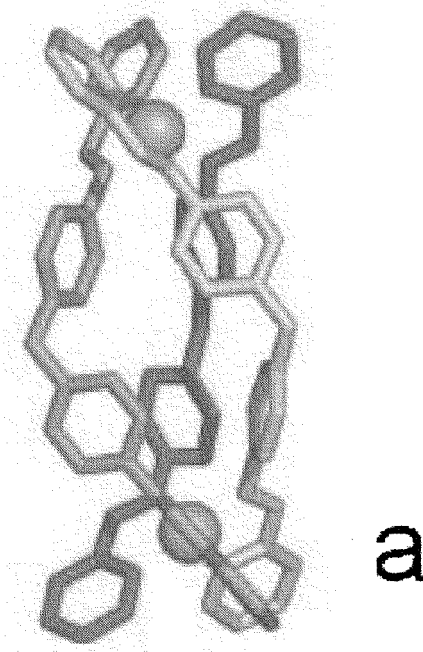


FIG. 2

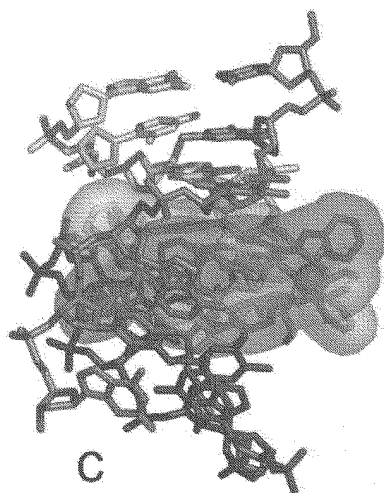
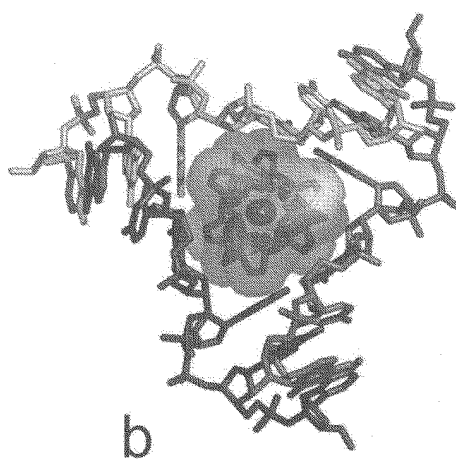
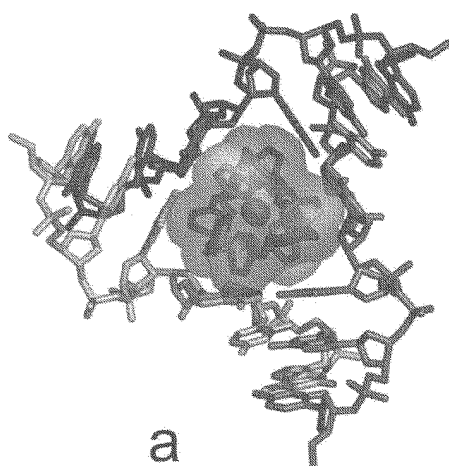
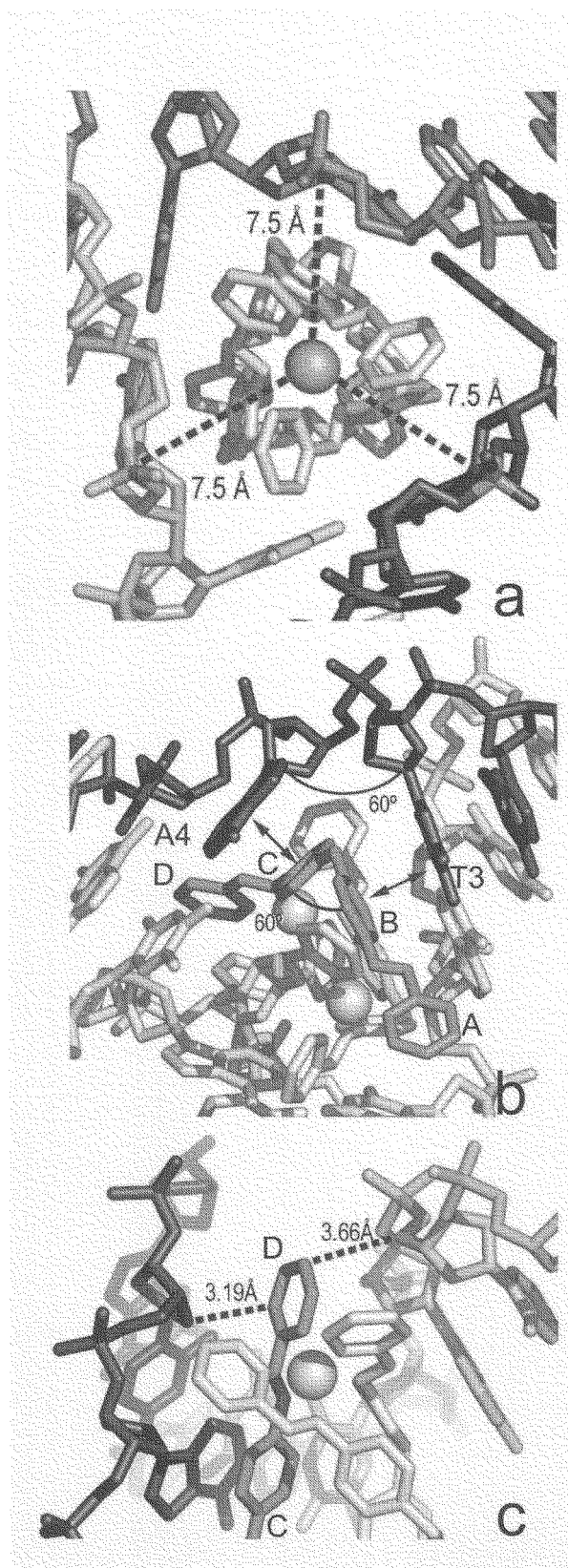


FIG. 3





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 318 936

② Nº de solicitud: 200600248

③ Fecha de presentación de la solicitud: 03.02.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C07H 21/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WOODS, K. C., MARTIN, S. S., CHU, V. C., BALDWIN, E. P. Quasi-equivalence in site-specific recombinase structure and function: crystal structure and activity of trimeric Cre recombinase bound to a three-way lox DNA junction. <i>Journal of Molecular Biology</i> . Octubre 2001, Vol. 313, Nº 1, páginas 49-69. ISSN 0022-2836.	1-5
A	SHLYAKHTENKO, L. S., POTAMAN, V. N., SINDEN, R. R. et al. Structure and dynamics of three-way DNA junctions: atomic force microscopy studies. <i>Nucleic Acids Research</i> . Septiembre 2000, Vol. 28, Nº 18, páginas 3472-3477. ISSN 1362-4962.	1-5
A	EICHMAN, B. F., VARGASON, J. M., MOOERS, B. H. M., HO, P. S. The Holliday junction in an inverted repeat DNA sequence: sequence effects on the structure of four-way junctions. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.</i> Abril 2000, Vol. 97, Nº 8, páginas 3971-3976. ISSN 0027-8424.	1-5
A	NOWAKOWSKI, J., SHIM, P. J., STOUT, C. D., JOYCE, G. F. Alternative conformations of a nucleic acid four-way junction. <i>Journal of Molecular Biology</i> . Junio 2000, Vol. 300, Nº 1, páginas 93-102. ISSN 0022-2836.	1-5
A	KADRMAS, J. L., RAVIN, A. J., LEONTIS, N. B. Relative stabilities of DNA three-way, four-way and five-way junctions (multi-helix junction loops): unpaired nucleotides can be stabilizing or destabilizing. <i>Nucleic Acids Research</i> . Junio 1995, Vol. 23, Nº 12, páginas 2213-2222. ISSN 0305-1048.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
20-33-2009

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/1