

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO.

N.º 98 564

REQUERENTE: VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED, americana, comercial e industrial, com sede em 40 Allston Street, Cambridge, Massachusetts 02139-4211, Estados Unidos da América

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A REALIZAÇÃO DE PROCESSOS CATALISADOS POR ENZIMAS COM CRISTAIS RETICULADOS COMO FORMA DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS E DISPOSITIVOS QUE OS CONTÊM"

INVENTORES: MANUEL A. NAVIA e NANCY L. ST. CLAIR

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.
nos Estados Unidos da América em 3 de Agosto de 1990, sob o Nº 562,280.



RESUMO

A invenção refere-se ao processo para a realização de processos catalisados por enzimas mediante utilização de cristais reticulados para imobilização de enzimas para a preparação de produtos seleccionados, que compreende

- a) combinar-se pelo menos um substrato apropriadamente escolhido com pelo menos uma enzima que actua sobre o substrato e está sob a forma de cristais imobilizados reticulados; e
- b) manter-se a combinação produzida na operação a) sob as condições apropriadas para que a enzima actue sobre o substrato e origine o produto pretendido.

No âmbito da invenção estão também incluídos o processo de imobilização das enzimas sob a forma de cristais reticulados, opcionalmente liofilizados assim como os dispositivos que os contêm.

PEDIDOS DE DEPÓSITO RELACIONADOS

Este pedido de depósito é uma continuação à parte da Memória Descritiva da Patente Americana de Nº. de Série 07/562 280 emitida a 3 de Agosto de 1990 e intitulada "Processos para a preparação e uso de cristais reticulados como uma nova forma de imobilização enzimática". Os ensinamentos da patente acima referida são aqui incorporados como referência.

HISTORIAL DA INVENÇÃO

As enzimas são usadas como catalisadores industriais na preparação de especialidades químicas e finas de forma económica à escala laboratorial e industrial (Jones, J. B., Tetrahedron 42: 3351-3403 (1986)), para a preparação de produtos alimentares (Zaks et. al., Trends in Biotechnology 6:272-275 (1988)), e como agentes para a síntese de compostos orgânicos (Wong, C.-H., Science 244: 1145-1152 (1989); CHEMTRACTS-Org. Chem. 3:91-111 (1990)).

A produção baseada em enzimas pode reduzir significativamente a poluição ambiente grandemente implícita na produção à escala industrial de intermediários químicos que de outra forma não seriam usados, como revela a produção à escala industrial de acrilamida usando a enzima hidratase de nitrilo (Nagasawa, T. and Yamada, H., Trends in Biotechnology 7: 153-158 (1989)).

As enzimas são também usadas em aplicações biosensoras para detectar várias substâncias de interesse clínico, industrial e outros (Hall, E., "Biosensors", Open University Press (1990)). Na área clínica, as enzimas podem ser usadas em terapia extracorporal, tal como hemodiálise e hemofiltração, em que as enzimas removem selectivamente materiais residuais e tóxicos do sangue (Klein, M. e Langer, R., Trends in Biotechnology 4:179-185 (1986)). As enzimas são usadas nesta área porque funcionam eficientemente como catalisadores num intervalo lato de vários tipos de reacção, a temperaturas moderadas, e com estereoselectividade e especificidade para com o substrato. No entanto, existem desvantagens associadas ao uso de catalisadores enzimáticos cujo uso foi limitado a processos químicos laboratoriais e industriais (Akiyama et.

al., CHEMTECH 627-634 (1988)).

As enzimas são caras e relativamente instáveis em comparação com a maior parte dos catalisadores industriais e laboratoriais, mesmo quando usadas em meio aquoso onde normalmente as enzimas funcionam. Muitas das reacções químicas de interesse mais económico realizadas na prática comum são incompatíveis com o meio aquoso, em que, por exemplo, os substratos e produtos são frequentemente insolúveis ou instáveis, e em que a hidrólise pode competir significativamente como complemento, a recuperação de catalisadores enzimáticos solúveis a partir do produto de reacção e substrato que não reagiu no stock de alimentação requer frequentemente o uso de tecnologias de separação onerosa e complicada. Finalmente, as enzimas são de difícil armazenamento pois é indispensável manter a sua actividade e integridade funcional, durante períodos de tempo comercialmente razoáveis (meses a anos) sem ter que se recorrer a refrigeração 4°C a -80°C, para temperaturas de N₂ líquido), ou manter em solventes aquosos de força iónica adequada, pH, etc.

Os processos de imobilização de enzimas superaram, em alguns casos, estas desvantagens. A imobilização pode aperfeiçoar a estabilidade dos catalisadores enzimáticos e proteger a sua integridade funcional em ambientes com solventes rígidos e

temperaturas extremas características de processos químicos laboratoriais e industriais (Harrmeier, W. Trends in Biotechnology 3 : 149-153 (1985)). Processos de fluxo contínuo podem ser realizados com partículas enzimáticas imobilizadas em colunas, por exemplo, quando o stock de alimentação solúvel passa através das partículas e é gradualmente convertido em produto.

Tal como aqui é usado, o termo "imobilização de enzimas" refe-

refe-se à insolubilização do catalisador enzimático pela ligação a, encapsulação de, ou por agregação em, partículas macroscópicas (10^{-1} mm).

Numerosas revistas úteis sobre processos de imobilização de enzimas apareceram como literatura (Maugh, T. H., Science 223:474-476 (1984); Tremper, J., Trends in Biotechnology 3: 45-50 (1985)). Maugh descreve cinco processos principais de imobilização de enzimas, esses processos incluem: adsorção num suporte sólido (tais como resinas de permuta iónica); ligações covalentes a suportes (tais como resinas de permuta iónica, cerâmicas porosas ou camadas de vidro); retenção em gels poliméricos; encapsulação; e a precipitação de proteínas solúveis mediante reticulação das mesmas com reagentes bifuncionais duma forma à toa e não definida. Em adição, podem imobilizar-se todas as células (normalmente mortas e tornadas permeáveis) que evidenciaram a actividade enzimática desejada a níveis elevados (por exemplo, Nagasawa, T. e Yamada, H., Trends in Biotechnology 7: 153-158 (1989)).

Cada uma destas técnicas de imobilização apresentam as suas próprias vantagens e limitações e nenhuma delas pode ser considerada óptima ou dominante. Na maior parte delas, o catalisador enzimático representa por último apenas uma pequena fracção do volume total do material presente no reactor químico. Como tal, o volume do meio imobilizado é preparado a partir duma substância veicular inerte, mas frequentemente dispendiosa. Em todas elas, as interacções de imobilização das moléculas do catalisador enzimático umas com as outras e/ou com a substância veicular tendem a ser ocasionais e indefinidas. Como resultado, apesar destas interacções conferirem alguma estabilidade acrescida às moléculas do catalisador enzimático, a sua não-especificidade relativa e irregularida-

Wifama

de torna essa estabilização sub-ótima e irregular. Na maior parte dos casos, o acesso à zona activa do catalisador enzimático mantém-se mal definido. Adicionalmente, os processos de imobilização acima descritos falham porque se debatem com problemas associados com o armazenamento e refrigeração, e nem sequer podem imobilizar convencionalmente as enzimas normalmente manipuladas, como sendo permutadas de dentro dum para dentro de outro solvente de escolha, sem haver o risco para a integridade estrutural e funcional da enzima. Em termos práticos, excepto para a ligação com as partículas da substância veicular, as enzimas convencionalmente imobilizadas apresentam semelhanças estreitas às enzimas solúveis, e partilham com elas a susceptibilidade de desnaturação e perda de função em ambientes rígidos.

Em geral, os processos de imobilização conduzem à redução de taxas observadas em reacções catalisadas por enzimas relativamente às obtidas em solução. Este facto é principalmente uma consequência dos limites de difusão interna do substrato e difusão externa do produto com as partículas de enzima imobilizadas (Quiocho, F. A., e Richards, F. M., Biochemistry 5: 4062-4076 (1967)). A presença necessária da substância veicular inerte nas partículas enzimáticas imobilizadas aumenta a linha livre média entre o solvente exterior das partículas enzimáticas imobilizadas e a zona activa do catalisador enzimático promovendo, assim, esses problemas de difusão. Quando se trabalha com células imobilizadas, os problemas de imobilização são particularmente graves, mesmo se as paredes celulares e membranas se tornaram permeáveis de alguma forma ao substrato e produto, o que pode estar relacionado com as múltiplas actividades enzimáticas de contaminação, metabolitos, toxinas compreendidas nas células, e com a estabilidade das células em solventes rígidos e ambientes

Wifama

7

de operação de temperaturas elevadas. Uma técnica de imobilização aperfeiçoada que evita as limitações dos processos presentemente disponíveis será útil na promoção do uso de enzimas como catalisadores industriais, principalmente se forem apresentados como úteis numa grande escala (Daniels, M. J., Methods in Enzymology 136: 371-379 (1987)).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo para a imobilização de enzimas mediante a formação de cristais de enzimas e, principalmente, reticulando também os cristais resultantes usando para tal um reagente bifuncional; refere-se a cristais de enzimas reticulados e imobilizados (referidos como CLECs ou CLIECs) preparados por este processo; refere-se a liofilização como meio de aperfeiçoamento do armazenamento, manuseamento, e propriedades de manipulação de enzimas imobilizadas e a um processo de produção dum produto desejado por meio duma reacção catalisada por um CLEC ou por um conjunto de CLECs.

No processo da presente invenção, pequenos (10-1 mm) cristais proteicos desenvolvem-se em soluções aquosas ou em soluções aquosas que compreendem solventes orgânicos, em que o catalisador enzimático é funcionalmente e estruturalmente estável. Numa realização preferida, os cristais são então reticulados com um reagente bifuncional, tal como o glutaraldeído. Esta reticulação origina a estabilização do contacto da gelosia de cristal entre as moléculas do catalisador enzimático específico que constituem o cristal. Como resultado desta estabilização acrescida, os cristais enzimáticos imobilizados e reti-

culados podem funcionar a temperaturas elevadas, pH extremos e meios aquosos rígidos, orgânicos, ou meios quase anidros, incluindo misturas destes. Isto é, um CLEC da presente invenção pode funcionar em ambientes incompatíveis com a integridade funcional da enzima natural correspondente não cristalizada e não reticulada, ou catalisadores enzimáticos convencionalmente imobilizados.

Adicionalmente, os CLECs preparados a partir deste processo podem ser submetidos a liofilização produzindo um CLEC liofilizado que pode armazenar-se na sua forma liofilizada numa sala a temperaturas de não-refrigeração durante longos períodos de tempo, e que pode ser facilmente reconstituído em solventes aquosos, orgânicos ou numa mistura solvente aquoso-orgânico de escolha, sem que ocorra formação de suspensões amorfas, e com um risco mínimo de desnaturação.

A presente invenção refere-se também aos CLECs produzidos pelo presente processo e ao seu uso na produção industrial, a grande escala, ou à escala laboratorial de materiais seleccionados, moléculas quirais orgânicas, peptídeos, carboidratos, lípidos, ou outras espécies químicas. Presentemente, estes são preparados tipicamente pelos processos químicos convencionais, que podem requerer condições duras (por exemplo, solventes aquosos, orgânicos ou quase anidros, mistura de solventes aquoso/orgânicos ou temperaturas elevadas) que são incompatíveis com a integridade funcional dos catalisadores enzimáticos naturais, não cristalizados e não reticulados. Outras macromoléculas com actividade catalítica podem também ser incorporados na tecnologia CLEC proposta, podendo incluir anticorpos catalíticos (Lerner et al., R.A., Benkovic, S. J., e Schultz, P.G., Science 252: 659-667 (1991) e polinucleotídeos (Cech, T. R., Cell 64:667-669 (1991); Celandier, D. W., e Cech,

T. R., 251:401-407 (1991)).

A presente invenção refere-se também a um processo de preparação dum produto escolhido por meio duma reacção catalisada pelo CLEC da presente invenção.

Num exemplo do processo e prática da presente invenção, foram usadas a enzima termolisina e metaloprotease de zinco para sintetizar um precursor quiral do edulcorante artificial dipeptidil, aspartame. A enzima termolisina foi cristalizada a partir duma solução aquosa de iniciação de sulfóxido de dimetil a 45 %, acetato de cálcio 1,4M a 55 % e cacodilato de sódio 0,05M, pH 6,5. Os cristais resultantes foram reticulados com glutaraldeído para formar uma termolisina CLEC. A termolisina CLEC foi então transferida a partir da solução de cristalização aquosa na qual foi preparada, para uma solução de acetato de etilo que compreendia os substratos, ácido N-(benziloxycarbonil)-L-aspartico (Z-L-Asp) e éster L-fenilalanina metílico (L-Phe-OMe). A termolisina CLEC foi então usada para catalisar a reacção de condensação dos dois substratos para sintetizar o éster N-(benziloxycarbonil)-L-aspartil-L-fenilalanina metílico (Z-L-Asp-L-Phe-OMe), que é o precursor dipeptidilo do edulcorante artificial aspartame. Usando uma das muitas técnicas conhecidas (ver, por exemplo, Lindeberg, G., J. Chem. Ed. 64: 1062-1064 (1987)) o ácido L-aspartico no precursor dipeptidilo pode ser protegido mediante remoção do grupo benziloxycarbonilo (Z-) para produzir aspartame (L-Asp-L-Phe-OMe).

Num segundo exemplo do processo e prática da presente invenção, a enzima termolisina foi usada para produzir CLECs termolisina. A actividade e a estabilidade dos CLECs termolisina foram comparadas às das termolisinas solúveis sob condições



Óptimas e condições de pH e temperatura extremas, seguindo-se a incubação em presença de solventes orgânicos e posteriormente a incubação em presença de protease exógena.

A enzima termolisina foi cristalizada a partir duma solução de acetato de cálcio 1,2 M e sulfóxido de dimetilo a 30 % pH 8,0. Os cristais resultantes foram reticulados com glutaraldeído a uma concentração de 12,5 % para se obter uma termolisina CLEC. A termolisina CLEC foi então liofilizada por meio duma técnica padrão (Cooper et T. G., The Tools of Biochemistry, páginas 379-380 (John Wiley and Sons, NY (1977)) para se obter uma enzima CLEC liofilizada da termolisina. Esta CLEC liofilizada foi então transformada directamente dentro de dois solventes uma mistura dum solvente aquoso/orgânico e um solvente orgânico, diferentes e escolhidos sem intervir com uma técnica de permuta de solventes e sem a formação de suspensões amorfas, e com um risco mínimo de desnaturação. Estes solventes incluem acetonitrilo, dioxano, acetona e tetrahidrofurano, mas não excluem outros. Após a incubação, foi testada a actividade por meio de espectrofotometria por clivagem do substrato dipeptídico FLAGA (amida furilacrilóil-glicil-L-leucina).

Num terceiro exemplo do processo e técnica da presente invenção a enzima elastase (suco pancreático do suíno) foi cristalizada a partir duma solução aquosa de 5,5 mg/ml de protefina em acetato de sódio 0,1 M a um pH de 5,0 à temperatura ambiente (Sawyer, L. et al., J. Mol. Biol. 118:137-208). Os cristais resultantes foram reticulados com glutaraldeído a uma concentração de 5 % para se obter uma elastase CLEC. A elastase CLEC foi liofilizada como se descreve no Exemplo 2.

Num quarto Exemplo do processo e prática da presente invenção,

Wifama

tal como aqui é desvendado a enzima esterase (fígado de suíno) foi cristalizada a partir duma solução aquosa de 15 mg/ml de proteína em acetato de cálcio a 0,25 M a um pH de 5,6 à temperatura ambiente. Os cristais resultantes foram reticulados com glutaraldeído a uma concentração de 12,5 % para se obter uma esterase CLEC. A esterase CLEC foi liofilizada como descrito no EXEMPLO 2.

Num quinto exemplo do processo e prática da presente invenção e tal como aqui se desvenda, a enzima lipase (Geotrichum Candidum) foi cristalizada a partir duma solução aquosa de 20 mg/ml de proteína em Tris 50 mM a pH 7 à temperatura ambiente. Os cristais resultantes foram reticulados com glutaraldeído a uma concentração de 12,5 % para se obter uma lipase CLEC. A lipase CLEC foi liofilizada como se descreve no Exemplo 2.

Num sexto exemplo do processo e prática da presente invenção, a enzima lisozima (clara de ovo) foi cristalizada a partir duma solução aquosa de 40 mg/ml de proteína num tampão de acetato de sódio a 40 mM compreendendo cloreto de sódio a 5 % a um pH 7,4 à temperatura ambiente (Blake, C.C.F. et al., Nature, 196:1173 (1962)). Os cristais resultantes foram reticulados com glutaraldeído a uma concentração de 20 % para se obter uma lisozima CLEC. A lisozima CLEC foi liofilizada como descrito no Exemplo 2.

Num sétimo exemplo do processo e prática da presente invenção, a enzima asparaginase (Escherichia coli) foi cristalizada a partir duma solução aquosa de 25 mg/ml de proteína em acetato de sódio e etanol a 33 % a um pH de 5,0 a 4º C. A cristalização é uma modificação da técnica descrita por Grabner et al., /Memória Descritiva da Patente Norte Americana nº. 3.664.926

(1972)7. Tal como aqui é descrito, os cristais resultantes foram reticulados com glutaraldeído a uma concentração de 7,5 % para se obter uma asparaginase CLEC. A asparaginase CLEC foi liofilizada como descrito no Exemplo 2.

Outras enzimas que podem ser imobilizadas de forma idêntica e usadas para catalisar reacções adequadas incluem luciferase e urease. Outras enzimas, tais como as mencionadas nas Tabelas 1 a 5, podem também ser cristalizadas e reticuladas segundo o processo presente, para produzir uma CLEC desejada que pode, por sua vez, ser usada para catalisar uma reacção que resulta na produção dum produto escolhido ou para catalisar uma reacção que é uma fase intermediária (isto é, uma de entre uma série de reacções) na produção dum produto seleccionado. Reconhece-se que apesar da reticulação ajudar a estabilizar a maioria dos cristais, nem sempre é necessário ou desejável em todos os casos. Algumas enzimas cristalinas retêm integridade funcional e estrutural em ambientes agressivos mesmo na ausência de reticulação. Apesar de nas realizações preferidas, o cristal ser reticulado, a reticulação não é sempre necessária para produzir um cristal enzima útil no presente processo.

Os CLECs possuem várias características-chave que conferem vantagens significativas sobre os processos convencionais de imobilização de enzimas presentemente usados. Os CLECs dispensam a necessidade duma estrutura de suporte inerte e separada. A lacuna dum suporte inerte melhorará as propriedades de difusão do substrato e produto dentro nos CLECs e desenvolverá concentrações de enzima dentro do cristal que são concentrações próximas ao limite de capacidade teórico para as moléculas de tal tamanho. Concentrações elevadas de enzimas podem conduzir a economia operacional significativa através dum au-

mento da actividade efectiva dum dado volume do catalisador, à redução no tempo de contacto do substrato com a enzima e redução global no tamanho da fábrica e em aplicações de capitais (Daniels, L.J., Methods in Enzymol. 136: 371-379 (1987)). A uniformidade através do volume do cristal e estabilidade aumentada do enzima constituinte em CLEOs cria novas oportunidades para o uso de catálise enzimática em condições duras, tais como temperaturas elevadas, solventes aquosos, orgânicos ou anidros, bem como misturas destes. Em complemento, o acesso restrito do solvente e o ambiente regular de proteína implícito numa gelosia de cristal deve conduzir à melhoria do metal iónico e retenção do co-factor para os CLEOs versus sistemas convencionais de enzimas imobilizadas.

ANÁLISE DE RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS

A Figura 1 é uma representação gráfica dos resultados obtidos para a actividade enzimática da termolisina CLEO solúvel.

A Figura 2 é uma representação de resultados dos resultados duma comparação das dependências de pH da termolisina CLEO e da termolisina solúvel.

A Figura 3 é uma representação gráfica de medições da actividade das termolisinas cristalinas e solúveis após a incubação a 65°C.

A Figura 4 é uma representação gráfica dos resultados obtidos para a resistência das termolisinas CLEO e solúvel para a degradação proteolítica exógena.

A Figura 5 é uma representação gráfica dos resultados obtidos para a actividade enzimática da elastase solúvel e para a elastase CLEO correspondente.

A Figura 6 é uma representação gráfica da resistên

cia de elastase solúvel e da elastase CILC correspondente à degradação proteolítica exógena.

A Figura 7 é uma representação gráfica dos resultados obtidos para a actividade enzimática da esterase solúvel e para a esterase CILC correspondente.

A Figura 8 é uma representação gráfica da resistência da esterase solúvel e da esterase CILC correspondente à degradação proteolítica exógena.

A Figura 9 é uma representação gráfica dos resultados obtidos para a actividade enzimática para a lipase solúvel e a lipase CILC correspondente.

A Figura 10 é uma representação gráfica dos resultados obtidos da actividade enzimática para a lisozima solúvel e a lisozima CILC correspondente.

A Figura 11 é uma representação gráfica dos resultados obtidos da actividade enzimática para a asparaginase solúvel e a asparaginase CILC correspondente.

DISCUSSÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Uma técnica geral simples que assegure a estabilidade e função para uma dada enzima ou conjunto de enzimas sob condições que são de interesse para a preparação sintética e que são demasiado duras para o uso com enzimas usadas nos processos presentemente disponíveis, seria muito útil. Os cristais de enzimas imobilizadas reticuladas (referidas como CILCs ou CILCS) tal como aqui descrito, podem ser usados para este propósito. A estabilização de geleia de cristal e dos catalisadores enzimáticos constituintes no cristal mediante reacção de reticulação permite o uso de CILCs em ambientes, incluindo solventes aquosos, orgânicos, ou anidros, misturas destes solventes, pH extremos e temperaturas elevadas, que são inco-

Wifam

patíveis com a função de enzima usando um processo presente-mente disponíveis. Em adição, a estabilização da geleia de cristal de ULECs torna possível a liofilização mediante processos-padrão. Os ULECs liofilizados podem ser armazenados por períodos de tempo comercialmente atractivos (meses a anos) em ausência de refrigeração e facilitam a utilização rápida e não complicada de ULECs em processos à escala laboratorial e industrial mediante a simples adição de solventes de escolha, sem necessitar da intervenção de processos de permuta de solventes. As ULECs são também altamente resistentes à digestão por parte de proteases enógenas. O processo da presente invenção facilita o uso de catalisadores enzimáticos versáteis nos processos químicos industriais de fluxo principal, bem como em síntese laboratorial de novos compostos para pesquisa.

Apesar da reticulação contribuir para a estabilidade do cristal enzima, nem sempre é necessária ou desejável em todos os casos. Algumas enzimas cristalizadas mantêm integridade funcional e estrutural em ambientes agressivos mesmo em ausência de reticulação. A realização preferida do presente processo inclui a reticulação dum cristal enzima e está descrita em detalhe nas secções que se seguem. Pretende-se que se entenda, no entanto, que as enzimas cristalizadas que não são subsequentemente reticuladas podem ser usadas em algumas realizações da presente invenção.

As interacções normais entre as moléculas constituintes da enzima na geleia cristalina duma ULEC resulta em poros bem definidos de tamanho limitado que conduzem as moléculas de enzima para dentro do corpo da partícula de ULEC. Como resultado, os substratos maiores que o tamanho de poros disponível não penetram no corpo da partícula de ULEC.

Como uma consequência do tamanho de poros limitado,

Wifama

muitas reacções enzimáticas de interesse académico e industrial envolvem substratos maiores do que o tamanho de poros das CMCs que estariam para além do âmbito da presente invenção. Tal incluiria a maioria das reacções que envolvem polímeros maiores, tais como proteínas, polinucleotídeos, polissacarídeos e outros polímeros orgânicos, em que o número de sub-unidades poliméricas seria tal que tornava o polímero maior do que o tamanho de poros do cristal nas CMCs. Em tais casos, no entanto, a catálise pode tomar lugar na superfície das CMCs.

A presente invenção é um processo de imobilização duma proteína escolhida, particularmente uma enzima, resultando na produção dum cristal enzima imobilizada reticulada (CMC) que pode ser usada para catalizar a preparação dum produto escolhido, tal como um peptídeo, carboidrato, lípido ou molécula orgânica quiral. A presente invenção refere-se ainda a tais CMCs e a um processo de preparar um produto escolhido por meio duma reacção catalizada por uma CMC ou por meio duma fase catalizada por uma CMC numa série de reacções. numa realização da presente invenção, o precursor dipeptídico do aspartame é produzido numa reacção de condensação catalizada pela termolisina imobilizada reticulada preparada a partir do presente processo. numa outra realização desta invenção, o substrato indicador, FAGIA, é submetido a clivagem para originar um produto colorimétrico cuja presença é indicadora da actividade enzimática numa termolisina CMC. A hidrólise de FAGIA tem sido usada como uma reacção modelo para indicar a robustez da termolisina CMC, em numerosos ambientes que seriam normalmente incompatíveis com a actividade da enzima.

Outras realizações desta invenção, as enzimas elastase, esterase, lipase, asparaginase e lisozima têm sido usadas para clivagem de várias substâncias indicadas, tais como acetato de p-nitrofenilo, (esterase e lipase), succinil-(ala)-

Wifama

-5-p-nitro-anilida (elastase), 4-metilumbeliferil D-acetil-quitriosido (lisozima) e HAD (asparaginase).

Pelo processo desta invenção, um perito na técnica pode adaptar um protocolo para a preparação dum produto desejado por meio duma reacção catalisada por uma enzima imobilizada. A enzima de interesse, quando cristalizada a partir de uma solução apropriada, pode ser reticulada com glutaraldeído ou com outro reagente bifuncional adequado na solução de cristalização para preparar uma CLEO dessa enzima. Subsequentemente, a CLEO da enzima de escolha pode ser liofilizada como se descreve no Exemplo 2.

Existem várias vantagens que o uso das CLEO apresenta sobre os processos catalisados por enzimas presentemente disponíveis. Por exemplo, a matriz do cristal reticulado numa CLEO desenvolve o seu suporte próprio. Não são requeridos leitos, vidros, gels ou películas de substâncias veiculares onerosas no sentido de vincular o catalisador enzimático, tal como é necessário nos processos de imobilização presentemente disponíveis. Como resultado a concentração da enzima numa CLEO é fechada para o limite de armazenamento teórico que pode ser alcançado para moléculas de um dado tamanho, excedendo grandemente as densidades alcançáveis mesmo em soluções concentradas. A CLEO inteira consiste na enzima activa (e não na substância veicular inactiva), e portanto, a redução das proporções da enzima na reacção relacionada com a difusão normalmente observada com as enzimas convencionalmente imobilizadas em relação às enzimas na solução deve ser minimizada, pois a conduta média livre para o substrato e produto entre a enzima e o solvente livre será grandemente reduzida para as CLEOs (em comparação com as partículas das substâncias veiculares de enzimas imobilizadas convencionais). Estas densidades proteicas elevadas serão particularmente úteis em aplicações biosensoras, analíticas e outras requerendo gran-

Wifama

des quantidades de proteínas em pequenos volumes. Em processos industriais, a performance e solidez das CLECs originam economia de operação significativa, através do aumento da actividade efectiva dum dado volume do catalisador, permitindo assim a redução do tamanho das fábricas, bem como o investimento em termos de capital (Daniels, M.J., Methods in Enzymol. 136: 371-379 (1987)). As CLECs são relativamente monodispersas, com um tamanho e forma macrostópicos reflectindo características naturais de crescimento de cristal dos catalisadores de enzimas individuais. A substituição do meio substância veicular - enzima imobilizada existente por CLECs não deve ser difícil, pois ambos os sistemas são comparáveis em tamanho e forma, e ambos podem ser similarmente recuperados a partir do stock de alimentação por meio de qualquer um dos processos simples, incluindo operações económicas básicas, tais como filtração, centrifugação, decantação de solvente, e outras.

Em adição, o uso de CLECs liofilizados permite o manuseamento e armazenagem rotineiros destes materiais antes do uso (armazenamento seco à temperatura ambiente sem refrigeração, por largos períodos de tempo). As CLECs liofilizadas permitem também a formulação rotineira por adição directa de solventes e substratos de interesse, sem requerer processos de permuta de solvente longos, ou a formação de suspensões amorfas. A forma CLEC liofilizada abrange a utilidade principal das enzimas como catalizadoras e um vasto espectro de enzimas e condições funcionais.

Uma segunda vantagem duma CLEC é que a reticulação das enzimas cristalizadas estabiliza e confere resistência à gelosia de cristal e às moléculas constituintes da enzima, quer mecânica quer química. Como resultado, uma CLEC pode ser o único meio de alcançar concentrações significativas do catalizador enzimático activo em solventes aquosos rígidos, orgâ-

Wifama

nicos e pró-anidros, ou em misturas de solventes aquosos-orgânicos. O uso de enzimas como catalizadores em sínteses orgânicas tem sido dificultado pela sua tendência para a desnaturação em presença de solventes não aquosos, e particularmente em misturas de solventes aquosos e não aquosos (Klibanov, A.N., Trends in Biochemical Sciences, 14: 141-144 (1989)). Nas CLECs, a restrição de mobilidade conformacional que conduz à estabilidade é desenvolvida pelos contactos inter-moleculares e reticulação entre as moléculas constituintes da enzima que formam a gelosia de cristal, e não pela ausência de água no meio. Como resultado, as concentrações intermédias da água podem ser toleradas pelas enzimas quando formuladas como CLECs, tal como não tem sido possível até aqui (ver Tabela 12). Em aplicações comerciais, as misturas de solvente aquoso-orgânicos permitem a manipulação da formação do produto tomando como vantagem as solubilidades relativas dos produtos e substratos. Mesmo em meios aquosos, os catalizadores enzimáticos imobilizados ou solúveis, são objecto de forças mecânicas dentro dum reactor que pode conduzir à desnaturação e uma vida média mais curta. A reticulação química da CLEC desenvolve a resistência mecânica necessária (Quioco e Richards, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 52: 833-839 (1964)) que resulta dum tempo de reactor aumentado para o catalizador enzimático.

Uma terceira vantagem duma CLEC é que como resultado da sua natureza cristalina, ela pode alcançar uniformidade ao longo de todo o seu volume de cristal reticulado. As enzimas cristalinas tal como aqui se descrevem, desenvolvem-se e são reticuladas em ambiente aquosos e, consequentemente, o arranjo das moléculas dentro da gelosia de cristal mantém-se uniforme e regular. Esta uniformidade é mantida pelos contactos inter-moleculares e reticulações químicas entre as moléculas da enzima que constituem a gelosia de cristal, mes

Wifama

mo quando permutadas entre outros meios aquosos, orgânicos ou pró-anidros, ou entre outros solventes mistos aquoso/orgânicos, em todos estes solventes, as moléculas da enzima mantêm uma distância uniforme entre elas, formando poros estáveis bem definidos dentro das CLECs que facilitam o acesso do substrato aos catalisadores enzimáticos, bem como a remoção do produto. A uniformidade da actividade enzimática é crítica em aplicações industriais, médicas e analíticas em que a reprodutibilidade e consistência são imprescindíveis.

Uma quarta vantagem do uso duma CLEC é o facto de ela exibir uma vida média operacional e de armazenagem aumentada. As interacções da gelosia, mesmo em ausência de reticulação, são conhecidas por estabilizar as proteínas, devido em parte às restrições dos graus de liberdade conformacional necessários para a desnaturação proteica. Nas CLECs, as interacções da gelosia, quando fixadas por reticulação química, são particularmente importantes na prevenção da desnaturação, especialmente nas misturas de solventes aquosos e não aquosos (Klibanov, A.M., Trends in Biochemical Sciences 14: 141-144 (1989)). As enzimas que estiveram no estado cristalino durante meses ou anos normalmente retêm uma elevada percentagem da sua actividade catalítica. Os cristais de enzimas reticuladas imobilizadas em solventes anidros serão mesmo posteriormente protegidas de danos e contaminação microbiana o que constitui um problema grave do armazenamento de grandes quantidades de proteínas num ambiente aquoso com nutriente rico. No caso duma CLEC liofilizada, a enzima imobilizada é armazenada em ausência de solvente. Tal facto, e a estabilização alcançada por reticulação permite o armazenamento em ausência de refrigeração durante longos períodos de tempo.

Uma quinta vantagem do uso duma CLEC é o facto de exibir a estabilidade aumentada em relação à temperatura como consequência da estabilização por reticulação da gelosia

Wifama

de cristal. Realizando reacções a temperaturas mais elevadas do que as que são usadas nos processos convencionais aumentam-se as taxas reaccionais para as reacções químicas de interesse quer termodinamicamente quer aumentando a taxa de difusão dentro e fora da gelosia de cristal das CLECs. Estes efeitos combinados poderão representar um aperfeiçoamento principal sobre a eficiência reaccional porque maximizam a produtividade de uma dada quantidade do catalisador enzimático, que é normalmente o componente mais oneroso do processo reaccional (Daniels, M.J., Methods in Enzymol. 136: 371-379 (1987)). A estabilidade à temperatura exibida pelas CLECs é notável porque a maior parte dos sistemas enzimáticos requerem condições reaccionais suaves. As CLECs serão também estabilizadas contra a desnaturação pelas temperaturas elevadas transitórias durante a armazenagem.

Uma última vantagem do uso de uma CLEC é que os poros de tamanho e formas regulares são criados entre as moléculas de enzima individuais na superfície inferior da gelosia de cristal. Esta acessibilidade de solvente restringida aumenta grandemente as características de retenção do co-factor ou iónica da CLEC em comparação com as enzimas imobilizadas convencionalmente ou em solução. Esta propriedade das CLECs permitirá o uso de processos de fluxo contínuo economicamente superiores (Ver por exemplo Oyama et al., Methods in Enzymol. 136: 503-516 (1987)) em situações em que a enzima poderia de outra forma ser inactivada por ião metálico branqueamento por co-factor. Por exemplo, na síntese mediada por termolisina do precursor dipeptídico aspartame, a Z-L-Asp-L-Phe-OMe, enzima convencionalmente imobilizada é conhecida como perdendo actividade catalítica em processos em coluna de fluxo contínuo, em parte através do branqueamento dos iões de cálcio essenciais para a actividade da termolisina. Na prática, o branqueamento dos iões cálcio forçou o uso de processos de lote menos

Wifama

eficientes (NaKanishi et al., Biotechnology 3: 459-464 (1985)). O branqueamento ocorre quando os complexos de cálcio iónico são formados com o substrato Z-L-Asp, em competição com as zonas de ligação do cálcio naturais na superfície da enzima, resultando na perda de actividade catalítica. A elevada densidade da enzima, e o volume correspondentemente limitado acessível ao solvente nos interstícios das CLECs, desencoraja a formação do complexo L-Asp-Ca⁺⁺ responsável pelo branqueamento por ião metálico.

Preparação das CLECs - Cristalização de enzimas

No processo da presente invenção, um cristal duma enzima imobilizada reticulada (ou CLEC) é preparado como se segue:

Os cristais da enzima são desenvolvidos por precipitação controlada de proteínas removidas da solução aquosa, ou da solução aquosa que compreende solventes orgânicos.

As condições a serem controladas incluem, por exemplo, a taxa de evaporação do solvente, a presença de co-solutos e tampões apropriados, e pH e temperatura adequados. Uma revista compreensiva dos vários factores que afectam a cristalização de proteínas foi publicada por McPherson (Methods Enzymol. 114:112 (1985)). Em adição, tanto McPherson como Gillingland (J. Crystal Growth 90: 51-59 (1988)) compilaram listas compreensivas de todas as proteínas e ácidos nucleicos que tinham sido registadas como cristalizadas, bem como as condições que conduziram à sua cristalização. Um compêndio de cristais e processos de cristalização, bem como uma erposição de coordenadas de proteínas tratadas por solvente e estruturas de ácidos nucleicos cristalinas, é mantida pelo Protein Data Bank (Bernstein et al., J. Mol. Biol. 112: 535-542 (1977)) no Brookhaven National Laboratory, Tais referências podem ser

Wifama

usadas para determinar as condições necessárias para a cristalização duma dada proteína ou enzima previamente cristalizada, com um prelúdio à formação duma CLEC apropriada, e pode guiar a formulação duma estratégia de cristalização para proteínas que não possuem. Alternativamente um ensaio inteligente e uma estratégia de investigação de erro (Ver por exemplo Carter, C. W. Jr. e Carter, C. W., J. Biol. Chem. 254: 12219-12223 (1979)) podem, na maioria dos casos, produzir condições de cristalização adequadas para a maior parte das proteínas, incluindo, mas não se limitando a, às acima discutidas, ao facto de se incrementar um nível aceitável de pureza que pode ser alcançado por estas. O nível de pureza requerido pode variar largamente de proteína para proteína. No caso da lisozima, por exemplo, a enzima pode ser directamente cristalizada a partir da sua fonte não purificada, a clara do ovo (Gilliland, G. L., J. Crystal Growth 90: 51-59 (1988)).

Para uso como CLECs no processo desta invenção, os cristais simples maiores que são necessários para as análises de difracção de raios X não são requeridos, e podem, de facto, serem indesejáveis devido a problemas de difusão relacionados com o tamanho do cristal. Cristais pulverizados microcristalinos (isto é cristais cujo tamanho/secção transversal se situa na ordem de 10^{-1} mm) são adequados para as CLECs e são frequentemente observados como raramente resistentes no que se refere à literatura cristalográfica de raios X. Os microcristais são muito úteis no processo desta invenção para minimizar problemas com a difusão (Ver por exemplo, Quiocho, F. A., e Richards, F. M., Biochemistry 5: 4062-4076 (1987)).

Normalmente, os cristais são produzidos por combinação da proteína a ser cristalizada com um solvente aquoso apropriado ou com um solvente aquoso que compreende os agentes precipitantes adequados, tais como sais ou compostos orgânicos. O solvente é combinado com a proteína à temperatura

Wifama

determinada experimentalmente como sendo apropriada para a indução da cristalização e aceitável para a manutenção da estabilidade e actividade da proteína. O solvente pode opcionalmente incluir co-solutos, tais como catiões bivalentes, co-factores ou quaatropos, bem como espécies tampão para controlo do pH. A necessidade de co-solutos e suas concentrações são determinadas experimentalmente para facilitar a cristalização. Num processo à escala industrial a precipitação controlada que conduz à cristalização pode ser realizada mediante a simples combinação da proteína, precipitante, co-solutos, e, opcionalmente, tampões num processo de em série. Em alternativa os processos de cristalização laboratoriais, tais como diálises, ou difusão de vapor podem também ser adaptados. McPhersons (Methods Enzymol. 114:112 (1985)), e Gilliland (J. Crystal Growth 90: 51-59 (1988)) incluem uma lista compreensiva de condições adequadas nas suas revistas da literatura de cristalização. Ocasionalmente, a incompatibilidade entre o reagente de reticulação e o meio de cristalização pode requerer a permuta de cristais dentro dum sistema solvente mais adequado.

Muitas das proteínas para as quais as condições de cristalização têm já sido descritas na literatura, possuem potencial considerável como catalisadores enzimáticos práticos em processos químicos laboratoriais e industriais, e são directamente submetidas à formulação como CLECs através do processo da presente invenção. A Tabela 1 é uma amostragem de enzimas que já têm sido cristalizadas. Note que as condições registadas na maioria destas referências foram optimizadas para o desenvolvimento de cristais grandes com qualidade de difracção, frequentemente com grandes esforços. Algum grau de ajuste das condições para cristais mais pequenos usados na produção de CLECs pode ser necessário em alguns casos.

Wifana

- 25 -

TABELA 1

Enzima	Fonte Biológica ou microbiana	Referências (incluindo as aqui ci- tadas)
álcool desidro- genase	fígado de cavalo	Eklund et al., J. Mol. Biol. 146: 561-587 (1981)
álcool oxidase	Pichia pastoris	Boys et al., J. Mol. Biol. 208: 211-212 (1989) Tykarska et al., J. Pro- tein Chem. 9: 83-86 (1990)
*aldolase (frutose-bio- fosfato)	músculo de coelho músculo de vitelo músculo humano Drosophila mela- nogaster	Eagles et al., J. Mol. Biol. 45: 533-544 (1969) Heidmer et al., Science 171: 677-680 (1971) Goryunov et al., Biofi- zika 14: 1116-1117 (1969) Millar et al., Trans. Roy. Soc. Lond. B293: 209-214 (1981) Brenner et al., J. Biol. Chem. 257: 11747-11749 (1982)
*aldolase (PKDG)	Pseudomonas putida	Vandlen et al., J. Biol. Chem. 248: 2251-2253 (1973)

Wifana

TABELA 1 (Cont.)

Enzima	Fonte Biológica ou microbiana	Referências (incluindo as aqui ci- tadas)
*fosfatase alca- lina	Escherichia coli	Sowadski et al., J. Mol. Biol. 150: 245-272 (1981)
*asparaginase	Erwinia carotova Escherichia coli Escherichia coli Proteus vulgaris	North et al., Nature 224: 594-595 (1969) Epp et al., Eur. J. Bio- chem. 20: 432-437 (1971) Yonei et al., J. Mol. Biol. 110: 179-186 (1977) Tetsuya et al., J. Biol. Chem. 248: 7620-7621 (1972)
*anidrase car- bônica	eritrócito humano (C) eritrócito humano (B) eritrócito de bovino	Kannan et al., J. Mol. Biol. 12: 740-760 (1965) Kannan et al., J. Mol. Biol. 63: 601-604 (1972) Carlsson et al., J. Mol. Biol. 80: 373-375 (1973)
*catalase	eritrócito de cavalo Micrococcus luteus Penicillium vitale	Glauser et al., Acta Cryst. 21: 175-177 (1966) Marie et al., J. Mol. Biol. 129: 675-676 (1979) Vainshtein et al., Acta Cryst. A37: C29 (1981)

TABELA 1 (Cont.)

*catalase	fígado de bovino	Eventoff et al., J. Mol. Biol. 103: 799-801 (1976)
creatina quinase	coração de bovino músculo de coelho	Gilliland et al., J. Mol. Biol. 170: 791-793 (1983) McPherson, J. Mol. Biol. 81: 83-86 (1973)
*glutaminase	Actenobacter Glutanimasificans Pseudomonas 7A	Wlodawer et al., J. Mol. Biol. 99: 295-299 (1975) Wlodawer et al., J. Mol. Biol. 112: 515-519 (1977)
*glucose oxidase	Aspergillus niger	Kalisz et al., J. Mol. Biol. 213: 207-209 (1990)
* -lactamases	Staphylococcus aureus Bacillus cereus	Moult et al., Biochem. J. 225: 167-176 (1985) Sutton et al., Biochem. J. 248: 181-188 (1987)
*lacate deshidro <u>g</u> enase	suinos galinha peixe cão Bacillius stearo <u>g</u> thermophilus	Hackert et al., J. Mol. Biol. 78: 665-673 (1973) Pickles et al., J. Mol. Biol. 9: 598-600 (1964) Adams et al., J. Mol. Biol. 41: 159-188 (1969) Schar et al., J. Mol. Biol. 154: 349-353 (1982)
*lipase	Geotrichum can <u>d</u> idum	Hata et al., J. Biochem. 86: 1821-1827 (1979)

TABELA 1 (Cont.)

Enzima	Fonte Biológica ou microbiana	Referências (incluindo as aqui ci- tadas)
*lipase	suco pancreato de cavalo Mucor meihei suco pancreático humano	Lombardo et al., J. Mol. Biol. 205: 259-261 (1989) Brady et al., Nature 343: 767-770 (1990) Winkler et al., Nature 343: 771-774 (1990)
*luciferase	Firefly	Green. A.A., et al., Bio- chem. Biophys. Acta, 20: 170 (1956)
*luciferase	Vibrio harveyi	Swanson et al., J. Biol. Chem. 260: 1287-1289 (1985)
*nitrile hydra- tase	Brevibacterium R312 P. chlororaphis B23	Nagasawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun 139: 1305-1312 (1986) Nagasawa et al., Eur.J. Biochem. 162: 691-698 (1987)
*peroxidase	rábano raízes de rabano (Tipo E4)	Braithwaite et al., J. Mol. Biol. 106: 229-230 (1976) Aibara et al., J. Bio- chem. 90: 489-496 (1981)

TABELA 1 (Cont.)

Enzima	Fonte Biológica ou microbiana	Referências (incluindo as aqui ci- tadas)
*peroxidase	rábano Japonês	Morita Acta Cryst.A28: S52 (1979)
*peroxidase (cloreto)	Caldaromyces fumago	Rubin et al., J. Biol. Chem. 257: 7768-7769 (1982)
*peroxidase (citrocromo)	Sarchomyces cerevisae	Poulos et al., J. Biol. Chem. 253: 3730-3735 (1978)
*peroxidase (glutathione)	eritrócito bovino	Ladenstein et al., J. Mol. Biol. 104: 877-882 (1979)
*subtilisina	Bacillus subtilis (Novo) Bacilius amyloli- quefaciens (BPN') Bacilius subtilis (Carlsberg)	Drenth et al., J. Mol. Biol. 28: 543-544 (1967) Wright et al., Nature 221: 235-242 (1969) Petsko et al., J. Mol. Biol. 106: 453-456 (1976)
*superóxido dismutase	bovino espinafres Saccharomyces cerevisiae Esche richia coli	Richardson et al., J. Biol. Chem. 247: 6368- -6369 (1972) Morita et al., J. Mol. Biol. 86: 685-686 (1974) Beem et al., J. Mol. Biol. 105: 327-332 (1976)

Wifama

TABELA 1 (Cont.)

Enzima	Fonte Biológica ou microbiana	Referências (incluindo as aqui ci- tadas)
*superóxido dismutase	Bacillus stearo- thermophilus Pseudomonas ovalis	Bridgen et al., J. Mol. Biol. 105: 333-335 (1976) Yamakura et al., J. Biol. Chem. 251: 4792-4793 (1976)
*termolisina	Bacillus thermo proteolyticus	Matthews et al., Natu- re New Biol. 238: 37- -41 (1972)
*urease	feijão verde	Sumner, J.B., J. Biol. Chem. 69: 435 (1926)
*xilose isomerase	Streptomyces rubiginosus Arthrobacter B3728 Streptomyces olivochromogenes Streptomyces violaceoniger Actinoplanes missouriensis	Carrell et al., J. Biol. Chem. 259: 3230-3236 (1984) Akins et al., Biochym. Biophys Acta 874: 375- -377 (1986) Faber et al., Protein Engineering 1: 459-466 (1987) Glasfeld et al., J.Biol. Chem. 263: 14612-14613 (1988) Rey et al., Proteins: Struc.Func.Genet. 4: 165-172 (1988)

Wifama

Preparação das CLECs - Reacção de reticulação

Uma vez os cristais desenvolvidos num meio adequado, podem então ser reticulados. A reticulação origina a estabilização da gelosia de cristal introduzindo ligações covalentes entre as moléculas de enzima constituintes no cristal, tornando possível a transferência da enzima para dentro dum meio de reacção alternado que poderia de outra forma ser incompatível com a existência da gelosia de cristal, ou mesmo com a existência da proteína não desnatura intacta. A reticulação pode ser alcançada por uma vasta variedade de reagentes bifuncionais, apesar de, na prática, o glutaraldeído barato e simples se ter tornado no reagente de escolha. (Para uma listagem representativa de outros agentes de reticulação disponíveis, pode-se consultar por exemplo o catálogo de 1990 da Pierce Chemical Company).

A reticulação com glutaraldeído forma fortes ligações covalentes entre principalmente os resíduos aminoácidos de lisina dentro e entre as moléculas da enzima na gelosia de cristal que constituem o cristal. As interações da reticulação evitam a constituição das moléculas da enzima em cristal com regresso à solução, imobilizando ou insolubilizando as moléculas da enzima dentro das partículas microcristalinas (idealmente 10^{-1}). Os cristais macroscópicos, insolubilizados, imobilizados podem então ser prontamente separados a partir do stock de alimentação que compreende o produto e o substrato que não reagiu por meio de técnicas simples, tais como, filtração, decantação e outras. Esses cristais podem também ser usados em colunas embaladas de CLECs em processos de fluxo contínuo, onde eles exibem propriedades de retenção de iões metálicos e co-factores aumentadas.

Através do processo da presente invenção, as CLECs são obtidas para uso como catalisadores enzimáticos nos ambi-

entes existentes e nos novos ambientes. A estabilidade aumentada das CLECs, que resulta da reacção de reticulação, torna possível transferir a CLEC para dentro dum solvente (por exemplo, solventes aquoso, orgânico, ou anidros, ou uma mistura destes), em que de outra forma seria incompatível levar a cabo a operação no reactor químico e temperaturas elevadas com pH extremos. As partículas catalisadoras de CLEC macrostóptica podem também ser prontamente manipuladas permitindo a recuperação a partir do stock de alimentação através de processos simples, tais como filtração, centrifugação ou decantação do solvente. Em adição, estes podem ser usados em colunas embaladas em processos de fluxo contínuo.

Preparação de CLECs - Liofilização

Uma suspensão dum volume de cristais de termolisina reticulados em 10 volumes de água esterilizada a pH 7,0 foi liofilizada durante a noite usando para tal um liofilizador Virtis Model #24. Os cristais liofilizados foram armazenados à temperatura ambiente ou a 4°C antes da reconstituição, que foi completada pela adição de dez volumes do solvente de escolha directamente em cristais sobre os cristais retirados da armazenagem. Os cristais re-hidratados foram reconstruídos num tampão de acetato de cálcio 10 mM a pH 7,0 para as experiências de clivagem FAGLA. As CLECs liofilizadas reconstituídas foram rotineiramente armazenadas à temperatura ambiente. Em contraste, as enzimas solúveis requeriam armazenagem a -70°C para manter actividade específica superior a uma semana. Este protocolo foi usado para todas as enzimas descritas na exemplificação aqui incluída.

Síntese do precursor aspartame com a termolisina CLEC

O processo da presente invenção, através do qual as enzimas cristalizadas são produzidas, é abaixo descrito e exem

plificado pela preparação de cristais de enzimas reticuladas imobilizadas de termolisina para uso na produção do precursor dipeptidilo do aspartame, em acetato de etilo, que é um solvente praticamente anidro, orgânico. A termolisina, uma termolisina que pode ser cristalizada e cuja estrutura foi resolvida à resolução de 1,6 Å (Holmes e Matthews, J. Mol. Biol. 160: 623-639 (1982)), é um exemplo duma enzima que pode ser usada como CLEC no presente processo. A termolisina é usada na produção do edulcorante artificial aspartame (Isowa et al. Patente Norte Americana Nº. 4.436.925 (1984); Lindeberg, J. Chem. Ed. 64: 1062-1064 (1987); Nakanishi et al., Biotechnology 3: 459-464 (1985); Oyama, et al., Methods in Enzymol. 136: 503-516 (1987)). Até aqui, a maior parte dos aspartames parecem ser produzidos por meio de técnicas químicas sintéticas convencionais, apesar do uso de termolisinas convencionalmente imobilizadas em meios praticamente anidros ter originado resultados encorajantes (Oyama et al., J. Org. Chem. 46: 5242-5244 (1981); Nakanishi et al., Biotechnology 3: 459-464 (1985)). Aperfeiçoamentos das experiências enzimáticas para a produção de aspartame, tal como é possível através do uso do processo presente, torná-lo à competitivo em relação ao processo presentemente usado, quer em termos de conveniência quer em termos de custo (Oyama et al., Methods in Enzymol. 136: 503-516 (1987)).

Avaliação das termolisina CLECs

O processo da presente invenção foi também usado para produzir termolisina CLECs que têm sido avaliadas pela sua dependência ao pH e estabilidade, estabilidade e temperaturas elevadas, resistência à proteólise exógena e estabilidade em presença dum solvente orgânico. As termolisina CLECs foram comparadas à termolisina solúvel, como descrito em detalhe no Exemplo 2 e Figuras 1 a 4. Os resultados da avalia-



ção revelou o seguinte:

1. Em relação à dependência ao pH e estabilidade, ambas as formas demonstraram actividade máxima a pH 7 e demonstraram actividade similar no intervalo ácido. No intervalo de pH alcalino, a CLEC mantém actividade máxima a pH 10; a termolisina solúvel apresenta 75% da actividade a pH 8,5 e apenas 25% da actividade a pH 9 e é completamente inactiva a pH 9,5.
2. A estabilização adicional alcançada com as CLECs resulta na actividade enzimática a temperaturas mais elevadas do que a que é possível com a termolisina solúvel. A estabilidade aumentada da termolisina CLEC a temperaturas mais baixas torna o armazenamento mais simples do que o da enzima solúvel. A estabilidade térmica e resistência à autólise foi também demonstrada para as termolisina CLECs, que retêm o máximo de actividade após cinco dias de incubação a 65°C. Em contraste, a termolisina solúvel perdeu 50% da sua actividade inicial duas horas após a incubação e revelou actividade reduzida após 24 horas de incubação a 65°C.
3. A actividade enzimática das termolisina CLECs não foi afectada pelo período de incubação de quatro dias em presença do poderoso protease dos estreptococcus, Pronase^R. Em contraste, a termolisina solúvel foi rapidamente degradada e perdeu praticamente toda a actividade após 90 minutos de incubação.
4. As termolisina CLECs e a termolisina solúvel exibiram estabilidades marcadamente diferentes em presença de solventes orgânicos, tal como se refere na Tabela 12. As termolisinas CLECs mantiveram uma actividade máxima superior 95% após a avaliação e depois de serem submetidas a um período de incubação em todos os solventes orgânicos.

Estas características das termolisinas CLECs e de

Wifama

outras enzimas CLECs tornam-as particularmente úteis, pois são mais fáceis de armazenar, mais estáveis e menos facilmente inactivadas ou degradadas do que as enzimas solúveis correspondentes.

Avaliação das esterase CLECs

O processo da presente invenção foi também usado para produzir esterase CLECs que têm sido avaliadas pela sua actividade e resistência à proteólise exógena. As esterase CLECs foram comparadas à esterase solúvel, como descrito em detalhe no Exemplo 4 e Figuras 7 e 8. Os resultados da avaliação revelaram o seguinte:

1. A esterase CLECs mantiveram aproximadamente 50% da actividade em comparação com a enzima solúvel.
2. A esterase solúvel foi altamente susceptível à degradação proteolítica. A actividade da esterase solúvel foi reduzida a 50% da actividade inicial após 10 minutos de incubação em presença da protease. Uma hora após o período de incubação a enzima solúvel tinha perdido mais do que 90% da sua actividade inicial. Em contraste, a actividade enzimática das esterase CLECs não foi afectada pela incubação com a protease.

Avaliação das lipases CLECs

O processo da presente invenção foi também usado para produzir as lipases CLECs que têm sido avaliadas pela sua actividade. As lipases CLECs foram comparadas com as lipases solúveis, como descrito em detalhe no Exemplo 5 e Figura 9. Os resultados da avaliação demonstraram que as lipases CLECs retêm aproximadamente 90% da actividade em comparação com a enzima solúvel.

Avaliação das lisozimas CLECs

O processo da presente invenção foi também usado para produzir lisozimas CLECs que foram avaliadas pela sua actividade e resistência à protease exógena. As lisozimas CLECs foram comparadas com as lisozimas solúveis, como descrito em detalhe no Exemplo 6 e Figura 10. Os resultados da avaliação demonstraram que as lisozimas CLECs retêm aproximadamente 50% da actividade em comparação com a enzima solúvel.

Avaliação das asparaginases CLECs

O processo da presente invenção foi também usado para produzir asparaginases CLECs que foram avaliadas pela sua actividade. As asparaginases CLECs foram comparadas com as asparaginases solúveis, como descrito em detalhe no Exemplo 7 e Figura 11. Os resultados da avaliação demonstraram que as asparaginases CLECs retêm aproximadamente 77% da actividade em comparação com a enzima solúvel.

Aplicações gerais das CLECs

Tal como aqui é desvendado as CLECs representam uma nova tecnologia de uso vasto em muitas áreas, incluindo mas não se limitando a síntese à escala industrial, operações laboratoriais, biosensoras e aplicações médicas. Exemplos de vários sistemas que usam processos convencionais de imobilização de enzimas na sua execução são dados nas Tabelas 2 e 5 abaixo. Um perito na técnica deve estar apto em as adaptar, e adaptar sistemas similares à tecnologia CLEC desvendada nesta Memória Descritiva. Para ilustrar tal facto são discutidos exemplos específicos em maior detalhe a partir das categorias enunciadas.

A Tabela 2 abaixo apresenta exemplos que usam enzimas convencionalmente imobilizadas num processo industrial. Esses exemplos podem ser prontamente adaptados à tecnologia

Handwritten signature

CLEC aqui descrita.

TABELA 2

Enzima	Produção ou Aplicação	Substratos	Referências (incluindo as citadas)
*thermolisi <u>na</u>	*percursor aspartame	Z-Asp, L-Phe- -OMe	Oyama et al., J. Org. Chem. 46: 5242-5244 (1981) Nakanishi et al., Trends in Biotechnology 3: 459-464 (1985)
*subtilisina	*aspartame	L-Asp-L-Phe, OMe	Davino, A.A., US Patent 4293648 (1981)
*lipase	*substitutos de manteiga de cacau	óleos de palma	Harwood, J., Trends in Biochemical Sciences 14: 125-126 (1989) Macrae, A.R., J. Am. Oil Chem. Soc. 60: 291-294 (1983)
*hidratase nitrilo, nitrilase, amidase	*acrilamida	acrilonitri <u>lo</u>	Nagasawa, T. and Yamada, H., Trends in Biotechnology 7: 153-158 (1989)

Wigman

TABELA 2 (Cont.)

Enzima	Produção ou Aplicação	Substratos	Referências (incluindo as citadas)
*amino acilase (fungica) *esterase aminoácida *subtilisina *amidases *hidantionase *dehidrogenases específicas *amino peptidase *transaminase	*resolução aminoácida	aminoácido N-acil-D,L ésteres de aminoácidos D,L amidas de aminoácidos D,L hidantoínas ácidos a-hidroxicarboxílicos	Schmidt-Kastner, G. & Egerer, P. in Biotechnology vol 6a: 387-421 (1984) and references therein Fusee, M.C., Methods in Enzymology 136: 463 (1987) Fusee, M.C., Methods in Enzymology 136: 463 (1987)
*aminoácida desidrogenase +formato desidrogenase *L-aspartase *L-aspartase 4-decarboxilase aspartase + L aspartate 4 decarboxilase *ACL hidrolase	*produção: aminoácida geral *produção: aminoácida específica L-aspartic ácido L-alanino L-lisina L-cisteína L-isoleucina L-metionina	ácidos ceto ou hidroxifumarate/fumaric ácido, ammonium fumarate D,L-a amino e-caprolactama (ACL) ácido DL-2amino 2tiazolina 4carboxílico	Rozzell, J.D., Methods in Enzymology 136: 479 (1987) Enzymes in Industry, Ed Gerhartz, W., VCH Press 1990

Wifama

TABELA 2 (Cont.)

Enzima	Produção ou Aplicação	Substrato	Referências (incluindo as citadas)
*L-ACT hydro lase	L-isoleucina L-metionina		
*lyase	L-fenilalanina	cinnamato indole, L-	
*L-tryptophan synthetase	L-triptofano L-valina	-serino	
*fumarase	L-malico ácido	fumarato	
*hidantoina- se	D n carba- moil p-hidro xi-fenil gli cina	5p-hidroxi- -hidantoina	
*lipases, es terases	*resolução de racemates de stereoselec- tive sinthe- sis	synthetic chemistry	Jones, J.B., Tetra hedron 42: 3351- -3403 (1988) Butt, S. and Ro- berts, S.M., Natu ral Product Reports 489-503 (1986), and references ci- ted therein for a more comprehensive review of this area
* fumarase	*L-malic acido	ácido fumaric	Chibata et al., Methods in Enzymo logy 136: 455 (1987)

Wifama

TABELA 2 (Cont.)

Enzima	Produção ou Aplicação	Substrato	Referências (incluindo as citadas)
*lactase, β -galactosidases	*disaccharide synthesis eg galactosyl-N-acetyl galactosamine	lactose & N-acetyl galactosamine	Larsson et al., Methods in Enzymology 136: 230 (1987)
*lipase, esterase	*L-menthol	4 isomer mix	Fukui, S., Tanaka, A., Methods in Enzymology 136: 293 (1987)
*amidases	*D-valine (intermediate for pyrethroid insecticide fluvinatate)	D,L amino acid amide	Schmidt-Kastner, G. & Egerer, P. in Biotechnology vol 6a: 387-421 (1984) and references therein
*lipase (<i>Candida cylindracea</i>)	*R(+)2 phenoxipropionic acids (herbicides)	2chloro propionic acids	Biocatalysts in Organic Syntheses eds Tramper, van de Plas & Linko; Proceedings of International Symposium in Netherlands 1985

TABELA 2 (Cont.)

Enzimas	Produção ou Aplicação	Substrato	Referências (incluindo as citadas)
*lipases, <u>es</u> terases, <u>ami</u> dases, aldo- lases *proteases, peptidases *yeast lipase	*organic syn- theses mono- glycerides peptides *2(p-chloro- phenoxy) pro pionic acid: herbicide	resolution of racemic ester	Jones, J.B., Tetra nedron 42: 3351- -3403 (1988) Butt, S. and Ro- berts, S.M., Natu ral Product Reports 489-503 (1986), and references cited therein for a more comprehen- sive review of this area
*strictodine synthetase	*alkaloid production eg stricto- sidine		Pfitzner et al., Methods in Enzymo- logy 136: 342 (1987)
*penicillin acylase *penicillin amidase	*6-amino pe- nicillinamic acid and 7- -ADCA	penicillin G or V	Enz.Eng 6:291(1982) Enz.Eng.8:155
*hydroxyste- roid dehydro- genase	*steroid transfor- mations		Carrea et al., Me- thods in Enzymolo- gy 136: 150 (1987)

TABELA 2 (Cont.)

Enzimas	Produção ou Aplicação	Substrato	Referências (incluindo as citadas)
*5'phosphodiesterase, nucleases	*5'ribonucleotides		Keller et al., Methods in Enzymology 136: 517 (1987)
*esterase	* β -lactam precursor (chiral mono esters eg β amino glutaric acid monoalkyl ester)	corresponding diesters	Japanese patent application: 82-159, 493 (1981) Biseibutsu Company
*lipase	* β -blockers		Kloosterman, M et al., Trends in Biotechnology 6: 251-256 (1988)

Produção de acrilamida utilizando tecnologia CLEC

A descrição que se segue é uma descrição duma realização do processo da presente invenção: A adaptação da produção da acrilamida a partir de células imobilizadas que sobreproduzem enzima nitrilo hidratase (Nagasawa, T. e Yamada, H., Trends in Biotechnology 7: 153-158 (1989)) à tecnologia CLEC aqui previamente revelada.

A produção à escala industrial da acrilamida, um processo químico comodamente importante, foi descrito por Yamada e colaboradores (Nagasawa, T. e Yamada, H., Trends in Biotechnology 7: 153-158 (1989)). Kilotons de acrilamida por

dia são produzidos em reactores químicos carregados com células induzidas escolhidas como sobreprodutoras da enzima nitrilo hidratase. A nitrilo hidratase tem sido também registada como purificada e cristalizada a partir de duas fontes, Brevibacterium R312 (Nagasawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 139: 1305-1312 (1986) e P. chlororaphis B23 (Nagasawa et al., Eur. J. Biochem. 162: 691-698 (1987)). Tal como aqui é revelado as enzimas cristalinas podem cada uma delas ser imobilizadas por reticulação com glutaraldeído ou com outros reagentes de reticulação adequados para produzir uma CLEC. A nitrilo hidratase CLEC pode então ser usada num reactor convencional em vez de células induzidas correntemente usadas. A adaptação deste processo à tecnologia CLEC conduz a vantagens imediatas. Tais vantagens incluem: dimensões da fábrica reduzidas melhoria do fluxo de entrada como resultado da actividade aumentada por unidade de volume implícita na concentração mais elevada de enzimas nas CLECs, e substrato e taxa de difusão do produto aperfeiçoadas; redução da contaminação indesejada e reacções secundárias, como resultado da pureza mais elevada das CLECs; e sensibilidade reduzida à contaminação microbiana na ausência de células. Em adição, existem outros benefícios disponíveis apenas por um processo baseado nas CLECs. Esses benefícios incluem: operação e temperaturas mais elevadas para melhorar as taxas de reacção; a capacidade para operar em solventes aquosos, orgânicos e praticamente anidros, permitindo uma vida média aumentada quer em processamento quer em armazenamento, resultante da estabilidade mecânica e física mais elevada das CLECs, particularmente em solventes não convencionais.

Aplicações médicas da tecnologia CLEC - tratamento extracorporeal

O processo da presente invenção e uma CLEC ou con-

Wifama

junto de CLECs apropriadamente seleccionadas podem também ser usados para aplicações médicas. Uma CLEC ou um conjunto de CLECs podem ser usados, por exemplo, para remover um componente dum fluido, tal como sangue, normalmente alterando o componente, e então convertendo-o numa substância não prejudicial a um indivíduo ou numa substância que pode ser removida pelos processos orgânicos normais (por exemplo, via desintoxicação, degradação no fígado, excreção via renal). Nesta Memória Descritiva, uma CLEC ou conjunto de CLECs apropriadamente escolhidas são postas em contacto com um fluido corporal, que compreende o componente a ser alterado, ou um reagente (produto ou substrato) numa reacção em que o componente participa, sobre o qual a enzima CLEC actua. Como resultado, a enzima é capaz de actuar sobre o componente a ser alterado ou com uma outra substância que é um produto numa reacção em que o componente a ser alterado participa. A actividade da enzima resulta na alteração directa do componente a ser removido ou na alteração do produto da reacção em que o componente participa (fazendo assim a continuação da reacção impossível). Tal pode ser realizado mediante o uso dum dispositivo extracorporal que inclui uma CLEC ou conjunto de CLECs apropriadamente escolhidas e um meio de retenção que é feito dum material: tal como um material poroso em que uma CLEC é retida ou um tubo em que a CLEC esteja presente, que permite o contacto entre o próprio componente ou a substância no fluido que é um produto numa reacção em que o componente a ser alterado participa.

Tal pode ser alcançado mediante a inserção numa CLEC apropriada num compartimento corporal adequado, tal como, peritoneu ou um nódulo linfático, em que a CLEC terá acesso aos fluidos corporais. Esta inserção pode ser feita cirurgicamente ou por meio de uma injeção numa mistura CLEC. A injeção directa da CLEC para dentro do fluxo sanguíneo não será apro-

Wifama

- 45 -

priada, dado o elevado risco de embolia. O uso das CLECs apropriadas nesta área deve servir como uma alternativa aos processos genéticos na terapia de substituição de enzimas para corrigir uma deficiência natural, tal como, por exemplo, fenilcetonoria.

A Tabela 3 ilustra algumas aplicações médicas em que as CLECs podem ser usadas. Para a maior parte destes casos, o tratamento extracorporal encontra-se ainda em fase de pesquisa, mas os benefícios que as CLECs oferecem podem promover novos tratamentos em áreas que não existiam tratamentos alternativos anteriormente.

TABELA 3

Enzima usada	Remoção de	Doença/Pacientes Tratados	Referências
Asparaginase	Asparagina	Leucemia (Remoção de asparagina, um nutriente importante no cancro, danifica as células leucémicas que não podem produzir o aminoácido essencial-asparagina; as células normais podem produzir asparagina e por isso não são afectadas por este tratamento)	Klein, M. Lan- ger, R., Trends in Biotechnolo- gy 4: 179-185 (1986) e suas referências Chang, T.M.S., Methods in En- zymology 137: 444-457 (1987) e suas referên- cias

TABELA 3 (Cont.)

Enzima usada	Remoção de	Doença/pacientes Tratados	Referências
Heparinase	Heparina	Deshepariniza- ção para hemo- -perfusão de pacientes por exemplo diáli- se renal	Langer, R., et al., Science 217: 261-263 (1982)
Bilirubina oxidase	bilirubina	Icterícia neo- -natal	Lavin et al., Science 230: 543-545 (1985)
Carboxipepti- dase	Metotrexato	Pacientes sub- metidos a qui- mioterapia	Pitt, A.M., et al., Appl. Bio- chem. Biotechnol. 8: 55-68 (1983)
Tirosinase	Ácidos ami- no arométi- cos	Deficiências hepáticas exi- bindo eleva- ções patológi- cas de amino- ácidos	Chang, T.M.S., Sem. Liver Dis. Ser. 6: 148 (1986)
Fenilalanina amonialiase	Fenilalani- na	Fenilcetonuria e deficiência hepática	Ambrus, C.M., et al., J. Pharm. & Exp. Ther. 224: 598-602 (1983)

TABELA 3 (Cont.)

Enzima usada	Remoção de	Doença/Pacientes Tratados	Referências
Sistema de multi-enzimas incluindo: urease, glutamato desidrogenase, glucose, desidrogenase e uma transaminase	Ureia (convertida em ácido glutâmico)	Desintoxicação por deficiência crônica renal de pacientes	Chang, T.M.S., Methods in Enzymology 137: 444-457 (1987) e suas referências Chang, T.M.S., Enzym Eng. 5: 225 (1980)
Arginase	Arginina	Hiperargininemia familiar	Kanagas, J.J. et al., Biochem. Med. 27: 46-55 (1982)
Glutamato, desidrogenase e amoníaco	amoniaco	deficiência hepática	Maugh, T.H., Science 223: 474-476 (1984)

Uma aplicação particular do processo da presente invenção é o sistema heparina liase para a des-heparinização (Bernstein et al., Methods in Enzymology 137: 515-529 (1987), que é abaixo discutido.

Todos os dispositivos extracorporais espargidos com sangue, tais como diálise renal, hemofiltração artério-venosa contínua, ou oxigenadores por membrana extracorporal, requerem a heparinização do paciente para evitar a coagulação do sangue. No entanto, a heparinização do paciente origina complicações hemorrágicas e mantém-se um risco na segurança huma

Wifam

na. Estes problemas aumentam quando o tempo de espargir o sangue aumenta, por exemplo, com o oxigenador de membrana, e podem originar hemorragias graves. Após a terapia extracorporeal, a heparina pode ser removida do sangue usando para tal um dispositivo de heparinase no efluente do dispositivo extracorporeal que elimina toda a heparina do fluxo de sangue que retorna ao paciente e evita assim os problemas de heparinização.

As pesquisas publicadas (Langer et al., Science 217: 261-263 (1982)); Bernstein et al., Methods in Enzymology 137: 515-529 (1987), detalham os problemas apresentados pelas enzimas convencionalmente imobilizadas usadas nos dispositivos extracorporais. O problema principal é que a imobilização convencional origina uma baixa retenção da actividade enzimática por unidade de volume, requerendo assim um grande volume da enzima imobilizada para realizar a heparinização necessária. Este volume é demasiado grande para ser usado em seres humanos. No entanto, a elevada retenção de actividade por unidade de volume na CLEC, devido à falta dum suporte inerte evita este problema e oferece uma solução prática para a des-heparinização do ser humano. A estabilidade aumentada da CLEC reduz a des-associação da enzima a partir do cristal reticulado, sendo superior às enzimas convencionalmente imobilizadas menos estáveis porque a resposta imunitária resultante da clivagem da enzima é reduzida. A estabilidade da CLEC em função da temperatura evita a desnaturação da enzima devido a temperaturas transitórias elevadas durante o armazenamento, sendo similar quando a CLEC retém elevada actividade, mesmo quando armazenada a temperaturas elevadas. Acrescente-se que a CLEC é mais barata e o seu uso é mais conveniente do que o das suas contrapartes convencionalmente imobilizadas devido aos seus tempos de vida operacionais e de armazenagem serem mais longos.

Aplicações adicionais da tecnologia CLEC: biosensores

Wifama

Uma CLEC ou um conjunto de CLECs podem ser usadas como um componente dum sensor referindo-as como biosensores, detectar e/ou quantificar um elemento de análise de interesse num fluido, tal como, fluido corporal (por exemplo, sangue, urina), um meio reaccional laboratorial e químico, meio orgânico, água, meio de cultura e bebidas. Em alguns casos, o fluido em questão pode ser um gás, tal como num analisador de respiração alcoólica (Barzana, E., Klibanov A., e Karell, M., NASA Tech Briefs 13: 104 (1989)). Nesta aplicação uma CLEC ou conjunto de CLECs apropriadamente seleccionadas são postas em contacto com um fluido para ser analisado em relação ao elemento de análise de interesse. O elemento de análise de interesse pode ser directamente medido (por exemplo, nível de glucose no sangue) ou indirectamente (por exemplo, detectando ou quantificando uma substância que é um reagente (produto ou substrato) numa reacção em que o analito de interesse participa). Em ambos os casos, a CLEC é capaz de actuar sobre o elemento de análise ou a substância que é um reagente numa reacção em que o elemento de análise também participa. A actividade da enzima resulta numa permuta detectável (por exemplo, alteração do pH, produção de luz, calor, alteração do potencial eléctrico) que é detectada e/ou quantificada por meios de detecção apropriados (por exemplo, eléctrodo de pH, dispositivo sensor de calor ou luz, meios para medição de permuta eléctrica) Janata, J., et al., Anal. Chem. 62: 33R-44R (1990). Qualquer meio útil para detecção da alteração resultante do processo catalisado pela enzima pode ser usado. Um biosensor da presente invenção compreende uma CLEC ou conjunto de CLECs e um meio de retenção para as CLECs que permite o contacto entre as CLECs e o elemento de análise de interesse ou a substância no fluido que é um reagente na reacção em que o elemento de análise de interesse participa.

A Tabela 4 ilustra algumas aplicações biosensoras

em que as CLECs podem ser usadas. As enzimas correntemente imobilizadas são usadas nestas aplicações, mas apresentam baixa estabilidade, baixa densidade enzimática, tempo de vida curto e falta de reprodutibilidade. Estes exemplos podem ser prontamente adaptados à tecnologia CLEC aqui revelada.

TABELA 4

Enzima usada	Detecção de:	Aplicação	Referências
Glucose oxidase	Glucose	Diabetes	Daniles, B., Mossbach, K., Methods in Enzymology 137: 4-7 (1987) Hall, E. "Biosensors" Open University Press (1990) Taylor, R., Proceed. Biotechnology Conference (1989); 275-287 Anthony et al., "Biosensors, Fundamentals and Applications", Oxford University Press (1987)
Criatinina deiminase	Criatinina	Função renal	Tabata, M. et al. Anal. Biochem. 134: 44(1983)
Urease	Ureia	Função renal	Hsuie, G.H. et al., Polym. Mater. Sci. Eng. 57: 825-829 (1987)

Wifama

TABELA 4 (Cont.)

Enzima usada	Detecção de:	Aplicação	Referências
			Kobos, et al., Anal. Chem. 60: 1996-1998 (1988)
Lactato oxidase e desidrogenase	lactato	Aplicações clínicas	Blaedel, W.J. & Jenkins, R A., Anal. Chem. 48(8): 1240 (1976) Sagaguchi, Y. et al., J. Appl. Biochem. 3: 32 (1981)
Glucose-6-piruvato desidrogenase	Glucose-6-fosfato sa carose e ATP	diabetes e outras apli cações médi cas	ibid as glucose oxidase
Álcool desidrogenase, álcool oxidase	Etanol e outros alcoóis; ácidos acético e fórmico	Bafômetro e aplicações industriais	Romette, J.L. et al., Methods in Enzymology 137: 217-225 (1987) Ho, M.H., Methods in Enzymology 137: 271-288 (1987)
β -fructosidase	Sucrose	Aplicações industriais	Romette, J.L., et al., Methods in Enzymology 137: 217-225 (1987)
Colesterol oxidase	Colesterol	Ensaio de colesterol	Sato, I., Methods in Enzymology 137: 217-225 (1987)

W. J. J. J.

TABELA 4 (Cont.)

Enzima usada	Detenção de:	Aplicação	Referências
Catalase	Ácido úrico, colesterol	Arterioscle-róticos e outras apli-cações médi-cas	Satoh. I., Methods in Enzymology 137: 217-225 (1987)
Carboxi pep-tidase	metotrexato	Cancro	ibid as glucose oxidase
Anidrase car-bônica	Dióxido de carbono	Aplicações industriais, laborato-riais e am-bientais	ibid as glucose oxidase
L-aminoácido oxidase	aminoácidos	médicas e industriais	ibid as glucose oxidase
β -lactamase penicilina	penicilina	Aplicações médicas	Anzai et al., Bull. Chem. Soc. Jpn. 60: 4133-4137 (1988)
Fosftatase alcalina	Fosfato	Monitoriza-ção de meta-bólitos	ibid as glucose oxidase
Nitrato/nitri-to redutase	Nitratos e nitritos	Monitoriza-ção alimen-tar e de me-tabólitos	ibid as glucose oxidase
Aril-sulfa-tase	Sulfato	Monitoriza-ção de me-tabolitos	ibid as glucose oxidase

Wifama

TABELA 4 (Cont.)

Enzima usada	Detenção de:	Aplicação	Referências
Succinato desidrogena	Succinato	Industrial	ibid as glucose oxidase
Luciferase bacteriana	FMNH ₂ e reacções acopladas	Detecção de quantidades 10 ⁻¹⁸ de FMNH ₂ mediante medição de libertação fotónica	Wannlund J., et al. "Luminescent assays: Perspectives in endocrinology and clinical chemistry", Eds Serio, M. and and Pazzagli 1:125 (1982) Kurkijarvi et al., Methods in Enzymology 137: 171-181 (1987)
Luciferase de pirilampo	ATP e reacções acopladas	Detecção de quantidades 10 ⁻¹² de ATP mediante libertação fotónica	Kurkijarvi et al., Methods in Enzymology 137: 171-181 (1987) Murachi et al., Methods in Enzymology 137: 260-271 (1988)

No processo da presente invenção, tal como é realizado para análise de amostras num biosensor, é particularmente desejável a produção de sinais detectáveis o mais fortes possível a partir das quantidades mais pequenas possíveis de substrato e catalisadores. Nesse sentido, a tecnologia CLEC aqui desvendada é particularmente atractiva, pois é alcançada

a concentrações possível mais elevadas do catalisador enzimático num dado volume.

Frequentemente, foram realizados esforços consideráveis para acoplar uma reacção enzimática última de interesse, quer directamente, quer através de intermediários adequados, para a produção de luz através de enzimas semelhantes a luciferase (Kurkijarvi et al., Methods in Enzymol. 137: 171-181 (1988)). Tal é feito no sentido de obter vantagem da sensibilidade não paralela e eficiência do equipamento de detecção protónica, que permite a detecção de concentrações femtomolares dos produtos da reacção enzimática sob condições apropriadas. Seguindo este princípio, os sistemas biosensores foram desenhados usando enzimas imobilizadas convencionalmente, para detectar vários substratos de interesse clínico ou outros. Reacções de produção de luz foram acopladas para ensaio de reacções de detecção de substratos semelhantes a D-glucose, L-lactato, L-glutamato e etanol, entre outras, a concentrações extremamente baixas.

No que se refere a esta aplicação, a enzima luciferase obtida a partir de Vibrio harveyi foi registada como cristalizada (Swanson et al., J. Biol. Chem. 260: 1287-1289 (1985)). Os cristais desta luciferase podem ser reticulados com glutaraldeído ou outro reagente adequado para obter uma CLEC de luciferase. Para usos biosensores ou analíticos, uma CLEC de luciferase oferece muitas vantagens sobre as enzimas convencionalmente imobilizadas. Numa CLEC, o volume total da luciferase CLEC consiste na enzima que emite luz. Num sistema de enzima convencionalmente imobilizada, no entanto, 95% do volume total é apreendido pela substância veicular "inerte", cuja função se assemelha à absorção da luz emitida pela enzima. Em adição, a estabilidade aumentada das CLECs pode facilitar o armazenamento à temperatura ambiente, e torna também possível novas aplicações sensoras em ambientes duros e a tem

Handwritten signature

peraturas elevadas.

Aplicações adicionais da tecnologia CLEC - reacções laboratoriais

As CLECs podem ser usadas como reagentes laboratoriais ou em processos a grande escala, que podem ser usados para reacções laboratoriais. Algumas das categorias mais vastas de reacções são apresentadas na Tabela 5.

TABELA 5

Enzima usada	Tipo de reacção catalisada	Referências
Lipases, fosfolipases	Síntese estereoselectiva; incluindo esterificação, transesterificação, aminólise, lactonização, polimerização, acilação, oximólise e resolução de misturas recémicas	Zaks, A. & Klibanov, A.M. Proc.Nat.Acad. Sci.USA. 82: 3192-3196 (1985) Klibanov, A.M. Acc.Chem.Res. 23:114-120 (1990) and references therein Wong, C.H. Chemical Abstracts-Organic Chemistry 3: 91-111 (1990) and reference therein
Esterases	Síntese estereoselectiva e resolução	Kobayashi et al., Tetrahedron Letters

Wifama

TABELA 5 (Cont.)

Enzima usada	Tipo de reacção catalisada	Referências
		Vol. 25, #24: 2557-2560 (1984) Schneider et al., Agnew. Chem.Int.Ed. Engl.23(#1): 64-68 (1984)
Tirosinase	Oxidação de fenóis para produção de quinonas	Kazandjian, R.Z. and Kli banov.A.M.J. Am.Chem.Soc. 110: 584-589 (1986)
proteases, por exemplo subtili sina	acilação estereoselectiva de hidrocarbonetos	Riva et al., J.Am.Chem.Soc. 110: 584-589 (1988)
oxidases	selective oxidation of hydrocarbons	Klibanov,A.M. Acc.Chem.Res. 23: 114-120 (1990) and re ferences the rein
Outras enzimas que requerem co- factores: iso- merases, liases,	Síntese estereoselectiva	Wong,C.H.,Chem tracts-Organic Chemistry 3: 91-111 (1990)

Wifama

TABELA 5 (Cont.)

Enzima usada	Tipo de reacção catalisada	Referências
aldolases, glicossil transferases e glicosidases		and referen-ces therein
Outras enzimas que não requerem co-factores adicionados: flavo enzimas, pirido-xal fosfato enzi-mas, metalo enzi-mas	Síntese estereoselectiva	Wong, C.H., Chem tracts-Organic Chemistry 3: 91-111 (1990) and references therein
Enzimas que reque-rem co-factores quinases (ATP), oxiredutases (NAD/P), metil transferases (SAM), enzimas que requerem CoA, sulfurases (PAPS)	Síntese estereoselectiva	Wong, C.H., Chem tracts-Organic Chemistry 3: 91-111 (1990) and references therein

Schneider et al., (Agnew. Chem. Int. Ed. Engl. 23 (No.1): 64-68 (1984)) ilustra como as enzimas podem ser usa-das em sínteses orgânicas. Foi usada esterase de fígado de porco na transformação meso-ester dentro dum quiral mono-es-ter num tampão de fosfato aquoso.

As vantagens das reacções catalisadas por CLECs pa-
ra uso laboratorial são três. Primeiro, a CLEC retém elevada

actividade em ambientes rígidos (por exemplo, solventes aquosos, orgânicos praticamente anidros e suas misturas, e a temperaturas elevadas) que são típicos das experiências de síntese química laboratorial. Segundo, a CLEC exhibe elevada estabilidade operacional e de armazenamento que é apropriada para experiências laboratoriais intermitentes. Terceiro, a sua elevada actividade por unidade de volume permite tempos reacionais mais curtos e requer volumes mais pequenos da enzima (por unidade de actividade). Logo, a vantagem que as CLECs oferecem sobre as enzimas imobilizadas ou livres, desenvolvem processos de química orgânica com uma teia sintética altamente selectiva e alternativa.

Em todos estes casos abaixo descritos, aos quais não nos limitamos, apenas, o processo desta invenção pode ser adaptado por um perito na técnica para conversão dum processo usando uma enzima convencionalmente imobilizada catalisadora para o uso duma CLEC da enzima apropriada. As CLECs não podem apenas substituir as enzimas convencionalmente imobilizadas mas podem também ser usadas em transformações de células intermédias. A presente invenção será ilustrada a partir dos exemplos que se seguem, que não têm como objectivo limitá-la de qualquer modo possível.

Exemplo 1

Cristalização e reticulação da termolisina para síntese do precursor aspartamo, Z-Asp-Phe-OMe.

Cristalização

250 mg de termolisina obtida a partir do Bacillus termoproteolyticus foram adquiridas na Boehringer-Mannheim GmbH, e dissolvidos em 4 ml de sulfoxido de dimetilo (DMSO) a 45% e em acetato de cálcio 1,40 M a 55%, e cacodilato de

W. J. ...

sódio 0,50 M a pH 6,5. Estas condições de iniciação são similares às descritas por Matthews et al., para a produção de cristais termolisina com qualidades de difracção (ver, por exemplo, Holmes and Matthews, J. Mol. Biol., 160: 623-639 (1982)). A solução proteica foi então concentrada para um mililitro num micro-concentrador Centricon 10. Foi obtido um bom rendimento de microcristais através de um processo de cristalização luminosa, agora aqui descrito, em que se injectou rapidamente para dentro das soluções DMSO-termolisina, acima descritas, 1 ml de água, ou acetato de cálcio 1,40 M, cacodilato de sódio 0,50 M a pH 6,5. Neste processo obteve-se microcristais hexagonais de dimensões aproximadamente uniformes (aproximadamente 10^{-1} mm em comprimento).

Reticulação dos microcristais de termolisina

O protocolo usado neste exemplo específico do processo da presente invenção é uma adaptação do descrito por Nakanishi et al., (Biotechnology 3: 459-464 (1985)), em cujo protocolo a termolisina foi primeiramente adsorvida na base duma substância veicular composta por uma resina de permuta iónica Amberlite Xad-7, e subsequentemente imobilizada por reticulação com glutaraldeído (Quicho e Richards, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 52: 833-839 (1964)). Nesta exemplificação, os microcristais de termolisina acima obtidos foram centrifugados e peletizados, e o sobrenadante foi descarregado, 5 ml de glutaraldeído de grau técnico a 17,5%, em DMSO a 2,5%, acetato de cálcio 0,05 M e cacodilato de sódio 0,025 M, a pH 6,5 foram então adicionados aos microcristais. A mistura foi incubada com agitação suave a 37°C durante 4 horas. A reacção de reticulação foi terminada mediante lavagem repetida dos cristais com aliquotas de 10 ml de água para remover a solução glutaraldeído. Os cristais de termolisina reticulados lavados constituem a termolisina CLEC usada abaixo como catali-

Wifan

zador.

Síntese de Z-Asp-Phe-Ome numa solução aquosa

5 ml duma suspensão termolisina CLEC foram adicionados a um reactor de lote de agitação contínua e incubados a 37°C. Após centrifugação e decantação do sobrenadante, uma mistura de reacção aquosa foi adicionada às CLECs. Esta solução foi preparada misturando-se 80 mg de Z-L-Asp e 80 mg de L-Phe-Ome-Hcl em 1 ml de água, com ácido acético adicionado para se obter um pH de 7,0. As amostras foram removidas para análises por HPLC. A Tabela 6 mostra a altura do pico de HPLC do pico do substrato Z-L-Asp após o tempo indicado da reacção, normalizado para 1 ao tempo t=0. Devido ao facto do Z-L-Asp estar limitado nesta reacção e medição do seu esvaziamento é equivalente à medição do aparecimento do produto Z-L-Asp-L-Phe-Ome (Nakanishi et al., Biotechnology 3: 459-464 (1985)). A Tabela 6 compreende também a altura do pico normalizado do substrato limitante Z-L-Asp que restou, e uma estimativa do grau final da reacção. É evidente que a reacção prossegue até cerca de 20% da finalização dentro dos primeiros 30 segundos e aí estabilizada. Estes resultados são consistentes com as observações de Nakanishi et al. (Biotechnology 3: 459-464 (1985) quando se usa a termolisina convencionalmente imobilizada numa mistura de reacção aquosa, tal como descrito acima, e são atribuídos à solubilidade do Z-L-Asp-L-Phe-Ome em água.

TABELA 6

Tempo de reacção (s)	Altura do Pico (normalizado)	% de Completação
0	1.000	
30	0.727	27,3%

Wifana

TABELA 6 (Cont.)

Tempo de reacção (s)	Altura do pico (normalizado)	% de Completação
60	0.857	14,3%
120	0.940	6,0%
180	0.797	20,3%

Síntese de Z-Asp-Phe-OMe numa solução parcialmente anidra

5 ml duma suspensão CLEC termolisina foram adicionados a um reactor de lote de agitação contínua e incubados a 37°C. Após contrifugação e decantação do sobrenadante, uma mistura reaccional orgânica praticamente anidra foi adicionada às CLECs. Esta solução foi preparada misturando-se 80 mg de Z-L-Asp e 240 mg de L-Phe-OMe em 1 ml de acetato de etilo a 99% e água a 1%. As amostras foram removidas para análises por HPLC. A Tabela 7 mostra a altura do pico da HPLC do pico do substrato Z-L-Asp após o tempo indicado da reacção, normalizado para 1 ao tempo t=0. Devido ao facto do Z-L-Asp estar limitado nesta reacção a medição do seu esvaziamento é equivalente à medição do aparecimento do produto Z-L-Asp-L-Phe-OMe (Nakanishi et al. Biotechnology 3: 459-464 (1985)). A Tabela 7 compreende também a altura do pico normalizado do substrato limitante Z-L-Asp que restou, e uma estimativa do grau do completamento da reacção. Neste caso a reacção prossegue até cerca de 70% da completação dentro dos primeiros 30 segundos e aí estabiliza. Estes resultados são consistentes com as observações de Nakanishi et al. (Biotechnology 3: 459-464 (1985)) quando se usa a termolisina convencionalmente imobilizada numa mistura reaccional praticamente anidra, e são atribuídos à inibição do produto da enzima.

TABELA 7

TABELA 7

Tempo de reacção (s)	Altura do Pico (normalizado)	% de Completação
0	1.000	
30	0.323	67,7%
60	0.314	68,6%
120	0.305	69,5%
180	0.272	72,8%

Exemplo 2

Cristalização, reticulação e liofilização da termolisina e avaliação das características do produto resultante

Cristalização da termolisina

A termolisina (Diawa Kasei K. K., Japan) foi dissolvida em acetato de cálcio 10 mM (Sigma), pH 10,0 para uma concentração de 10% (p/v), o pH da solução foi mantido a 10,0 por titulação com NaOH 2 M. Após a solubilização completa, a solução proteica foi titulada para um pH 8,0 com HCl 2 M. Adicionou-se acetato de cálcio sólido para 1,2 M. Foi então adicionado sulfóxido dimetilo (Sigma) para 30%. A proteína foi concentrada para 100 mg/ml por ultrafiltração numa célula de agitação Amicon (membrana 10,000 MWCO). A enzima concentrada foi colocada em aliquotas e armazenada a -70°C. A termolisina foi cristalizada mediante a adição de 9 volumes de água esterilizada para um volume da solução proteica concentrada (100 mg/ml). A solução foi brevemente centrifugada e permitiu-se o repouso durante a noite à temperatura ambiente. Os cristais foram lavados com 10 volumes de acetato de cálcio 10 mM a pH 7,0 e recuperou-se mediante centrifugação de baixa velocidade (10 minutos a 1500 x G, centrifugadora Beckman GPR).

A adição rápida de água a uma solução concentrada (100 mg/ml) de termolisina induz a formação de cristais que se tornam visíveis sob magnificação de baixo poder dentro de 10 minutos. O tamanho do cristal é reprodutível em função da concentração proteica final. 3 volumes de água para um volume do concentrado termolisina (100 mg/ml) produzirão varas hexagonais com a capacidade de difracção de raio-X com 0,5 mm de comprimento que correspondem aos cristais anteriormente descritos por Colman et al., (Colman, P. M., Jansonius, J. N. e Matthews, B. W., J. Mol. Biol. 70: 701-724 (1972)), tal como foi confirmado por nós mediante as análises de difracção. Adicionando 10 volumes de água a um dos concentrados proteicos produziu-se o comprimento dos cristais resultantes para 0,05 mm. Estes microcristais são preferidos nas aplicações CLEC, pois eles tendem a minimizar os problemas de difusão relacionados com o tamanho do cristal (ver, por exemplo, Quioco, F. A. e Richards, F. M. Biochemistry 5: 4062-4076 (1967)). Dentro de um dado lote de proteínas o tamanho do cristal foi consistentemente uniforme. (Cristais de 0,05 - 0,10 mm em comprimento foram usados neste estudo para facilitar a pipetagem precisa das suspensões cristalinas). Visualizações densiométricas da SDS-PAGE revelaram uma purificação seis vezes superior da enzima em cristalização aumentando significativamente a actividade específica das CLECs. A cristalização resultou numa diminuição em 20% na actividade total da proteína CLEC em comparação à termolisina solúvel, quando testada por clivagem espectrofotométrica do substrato dipeptido furilacrilóil-glicil-L-leucina-amida (FAGLA), como abaixo se descreve.

Reticulação dos cristais termolisina

Os cristais termolisina foram reticulados durante 3 horas à temperatura ambiente numa solução de glutaraldeído

W. J. J. J.

a 12,5% (Sigma), DMSO 5% e Tris 50 mM pH 6,5. Os cristais reticulados foram lavados três vezes em água esterilizada e recuperados por centrifugação a baixa velocidade como descrito no que respeita à cristalização da termolisina. A reticulação química dos cristais enzimáticos estabiliza a gelosia de cristal e as moléculas de enzima constituintes no cristal suficientemente de forma a permitir o uso prático das CLECs nos ambientes que de outra forma seriam incompatíveis à função enzimática. Não existiu uma diferença mesurável na actividade enzimática entre os cristais reticulados e não reticulados quando testados (por espectrofotometria) por clivagem monitorizada do seu substracto dipeptido FAGLA (abaixo descrito). Além disso, a reticulação estabiliza as CLECs ao ponto de poderem ser liofilizadas, com retenção da actividade enzimática na sua totalidade sobre reconstituição em solventes aquosos, orgânicos, e misturas aquoso-orgânico como se mostra na Figura 1 e Tabela 8. Apesar da cristalização resultar numa diminuição de 30% da actividade específica da proteína CLEC em comparação à termolisina solúvel, a reticulação e liofilização das CLECs não diminuiu depois a actividade específica.

TABELA 8 - Actividade da Termolisina

	Tempo (min.)	Absorvância 345 nm	
		CLEC	Enzima solúvel
1	0,0	0,314	0,315
2	1,0	0,272	0,271
3	3,0	0,235	0,218
4	5,0	0,204	0,198
5	10,0	0,184	0,185
6	15,0	0,183	0,184

Actividade enzimática da termolisina CLEC e solúvel

A actividade catalítica da termolisina CLEC e solú

Wifama

vel foi testada (Feder, J. e Schuck, J. M., Biochemistry 9: 2784-2791 (1970)) por hidrólise do substrato do dipeptido bloqueado furilacriloil-glicil-L-leucina-amida (FAGLA) (Schweizerhall). A clivagem da ligação amida foi medida espectrofotometricamente por uma diminuição numa absorvância a 345 nm. A concentração inicial da enzima foi de 10^{-7} M por determinação proteica de Bradford e visualização densiométrica (Pharmacia LKB UltroScan XL) do gel SDS-PAGE de mancha Coomassie. A enzima CLEC é definida como cristais de termolisina reticulados liofilizados reconstituídos a enzima solúvel é definida como termolisina concentrada para 100 mg/ml. A enzima foi adicionada a um volume reaccional de 5 ml que compreendia o substrato. As aliquotas da mistura reaccional foram removidas aos tempos indicados, e a absorvância a 345 nm foi medida. A termolisina CLEC foi separada a partir da mistura reaccional por centrifugação breve (microcentrifugadora E, Beckman) antes da leitura da absorvância. A absorvância foi estabelecida para uma pseudo equação da taxa de primeira ordem e foram calculados os Kcat/Km dividindo o valor estabelecido pela concentração enzimática (Multifit 2,0 Curve Fitting for the Apple Macintosh Computer, Day Computing P. O. Box 327, Milton, Cambridge CB4 6WL, U.K. (1990)).

Dependência e estabilidade do pH

O pH ótimo e a estabilidade da enzima solúvel foram comparados com os da termolisina CLEC por clivagem do substrato dipeptido FAGLA. Os resultados são apresentados na Figura 2 e Tabela 9. Tanto a enzima solúvel como a enzima cristalina demonstraram uma actividade máxima a pH 7. As CLEC e as termolisinas solúveis demonstraram também actividade idêntica na gama acídica e o perfil de pH em forma de sino gerado pela enzima solúvel encontrava-se de acordo com os dados publicados (Feder, J. e Schuck, J. M., Biochemistry 9:

Wifama

2784-2791 (1970)). No intervalo de pH alcalino, no entanto, a enzima cristalina mantém a actividade máxima, a pH 10, enquanto que a enzima solúvel apresentou 75% de actividade a pH 8,5, e apenas 25% de actividade a pH 9. A pH 9,5, a enzima solúvel, é completamente inactiva.

TABELA 9 - Curva de pH Termolisina

		% Actividade máxima	
	pH	CLEC	Enzima solúvel
1	5,0	10,250	5,170
2	5,5	9,750	6,070
3	6,0	52,500	39,100
4	6,5	85,000	74,610
5	7,0	97,500	100,000
6	7,5	100,000	98,650
7	8,0	97,500	82,920
8	8,5	95,000	71,910
9	9,0	96,250	24,720
10	9,5	95,000	0,000
1	10,0	90,000	0,000

Estabilidade a temperaturas elevadas

Pode-se alcançar taxas de reacção mais elevadas e tempos de difusão mais baixos para substractos e produtos realizando a operação dum dado processo químico e temperatura mais elevada, em que normalmente nos encontramos limitados pela estabilidade da temperatura de substractos e produtos. Nas catálises baseadas em enzimas, no entanto, é frequente a perda de actividade enzimática que estabelece limite prático de temperatura a que o processo pode decorrer. A estabilização adicional alcançada nas CLECs permite actividade enzimática a temperaturas mais elevadas do que as possíveis com a

Wifama

enzima solúvel.

A estabilidade aumentada a temperaturas mais baixas simplifica a armazenagem rotineira de longa duração dos catalisadores CLECs. Por exemplo, foi necessário armazenar soluções concentradas (50 mg/ml) de termolisina solúvel a -80°C para manter a actividade específica máxima. À temperatura ambiente, a actividade foi normalmente perdida ao fim do primeiro dia. Contrariamente, as termolisinas CLECs re-hidratadas podem ser rotineiramente armazenadas durante meses à temperatura ambiente com nenhuma perda aparente de actividade. As CLECs liofilizadas não reconstituídas da termolisina parecem ser viáveis indefinidamente.

A estabilidade e resistência térmica à autólise foram demonstradas com as termolisinas CLECs após incubação a 65°C durante cinco dias consecutivos (Figura 3 e Tabela 10). As termolisinas CLECs mantiveram a sua actividade máxima após os cinco dias de incubação a temperaturas elevadas. Contrariamente, a termolisina solúvel perdeu 50% da sua actividade inicial após duas horas de incubação e demonstrou fraca actividade após 24 horas de incubação a 65°C .

TABELA 10 - Estabilidade térmica de Termolisina a 65°C

	Tempo (dias)	CLEC	Enzima solúvel
1	0,000	100,000	100,000
2	0,041		70,000
3	0,083	96,000	50,000
4	0,164		32,000
5	0,246		17,000
6	0,410	97,0	10,000
7	1,000	101,0	2,000
8	2,000	97,0	

Wifama

TABELA 10 (Cont.) - Estabilidade térmica de Termolisina a 65°C

	Tempo (dias)	CLEC	Enzima solúvel
9	3,000	94,0	
10	4,000	96,0	
11	5,000	92,0	

A actividade das termolisinas CLEC e solúvel foram medidas após a incubação a 65°C. A termolisina solúvel foi incubada em acetato de cálcio 10 mM, Tris 50 mM pH 7,0 num banho Maria a 65°C. O volume reaccional foi de 500 ul. A concentração proteica final foi de 10 mg/ml. As aliquotas foram removidas aos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 10 e 18 horas. As amostras foram ensaiadas por clivagem SDS-PAGE e FAGLA à temperatura ambiente como acima descrito. Para as termolisinas CLECs, 250 ul duma suspensão de cristal em acetato de cálcio 10 mM e Tris 50 mM foram também incubados num banho de água a 65°C. A actividade foi ensaiada aos tempos 0, 1, 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas por clivagem FAGLA.

Resistência à proteólise exógena

A avaliação da resistência da termolisina CLEC à acção duma protease exógena foi também realizada. As análises SDS-PAGE (Gel electroforese poli acrilamida de sulfato de dodecil de sódio) sugeriram que as enzimas comerciais podem compreender uma percentagem substancial de agentes contaminadores, alguns dos quais podem possuir actividade proteolítica contra as principais espécies de enzimas solúveis. Conferindo o armazenamento das moléculas de enzimas sobre a forma duma gelosia de cristal pode assumir-se que as moléculas de enzima no interior numa CLEC será protegida da proteólise. Para testar esta possibilidade as termolisinas CLECs e uma

Wifama

preparação duma enzima solúvel foram incubadas em presença duma protease de estreptococcus, Pronase^(R), uma protease não específica capaz de digerir a maior parte das proteínas dos aminoácidos livres (Calbiochem. 1990 Catalog; LaJolla, CA).

As termolisina CLEC e solúvel foram incubadas em Tris 50 mM, pH 7,5, a 40°C em presença da protease Pronase^R (Calbiochem). A proporção de Pronase^(R) para a termolisina foi de 1/40. Para inibir a autólise da termolisina e prevenir a destruição proteolítica da pronase pela termolisina, foi adicionado EDTA à reacção de enzima solúvel para uma concentração final de 100 mM (EDTA inibe a actividade da termolisina mas não da Pronase^(R)). Nos tempos indicados as alíquotas foram removidas a partir da mistura de reacção e a actividade foi ensaiada por espectrofotometria por clivagem dos substractos dipeptidos FAGLA. Para a inibição da termolisina estabelecida devido à presença do EDTA, o ensaio espectrofotométrico da actividade da enzima solúvel foi realizado num tampão de acetato de cálcio a 0,5 M a pH 7,0 e a concentração da enzima foi duplicada. A enzima cristalina reticulada foi ensaiada como acima se descreveu.

Tal como se pode ver na Figura 4 e Tabela 11, a termolisina solúvel foi rapidamente degradada e perdeu toda a actividade depois de 90 minutos de incubação. Contrariamente, a actividade da termolisina CLEC não foi afectada por quatro dias de incubação em presença da protease. Esta inacessibilidade à proteólise apresenta particular interesse em aplicações biosensoras de diagnóstico onde uma CLEC adequada possa ser chamada para actuar na presença dum cocktail desconhecido das enzimas proteolíticas que ocorrem naturalmente.

TABELA 11

Resistência à Protease

Wifama

TABELA 11

Resistência à Protease				
	Tempo (dias)	% Actividade Máxima		Tempo (min.)
		CLEC	Enzima solúvel	
1	0,000	100,0	100,0	0,000
2	0,003		25,0	5,000
3	0,010		17,5	15,000
4	0,021		9,5	30,000
5	0,042	98,0	3,0	60,000
6	0,063		1,0	90,000
7	0,084	101,0	0,0	
8	1,000	97,0		
9	2,000	99,0		
10	3,000	98,0		
11	4,000	96,0		

Estabilidade em presença dum dissolvente orgânico

Com o objectivo das enzimas ganharem a aceitação ideal como catalisadores industriais viáveis, elas devem ser capazes de funcionar sem intervenção excessiva no ambiente prático do processo de preparação. Particularmente, tal compreende o uso de solventes aquosos, orgânicos polares e não polares e suas misturas. Nas aplicações comerciais, as misturas de solventes aquoso-orgânicos permitem a manipulação da formação do produto tomando como vantagem as solubilidades relativas dos produtos e substratos.

As termolisinas solúveis e as termolisinas CLECs exibiram estabilidades marcadamente diferentes em presença de solventes orgânicos, (Tabela 12). As concentrações da enzima solúvel que podiam ser incubadas em solventes orgânicos foram limitadas a um máximo de 10 mg/ml. Valores de concentração superiores a este originaram a precipitação instantânea

da termolisina sob adição do solvente orgânico. Contrariamente, as concentrações das termolisinas CLECs foram limitadas apenas pelo volume ocupado pelos cristais. A termolisina solúvel manteve a sua maior actividade (75%) após incubação em acetona, e a sua menor actividade (36%) em tetrahidrofurano. Após uma hora de incubação em presença de acetonitrilo ou dioxano a enzima solúvel perdeu aproximadamente 50% da sua actividade inicial. A termolisina CLEC mais do que 95% da sua actividade máxima após a incubação com qualquer um dos solventes orgânicos testados.

TABELA 12

Enzima	% Actividade Máxima	
	Solúvel	CLEC
Acetonitrilo	42	102
Dioxano	66	97
Acetona	75	99
THF*	36	96

* Tetrahidrofurano

Estabilidade em solventes orgânicos

As preparações de termolisinas CLECs ou de termolisinas solúveis foram incubadas em soluções dos solventes orgânicos indicados a 50% (v/v). 100 ul duma pasta de termolisinas CLECs (10 mg/ml) em Tris 10 mM pH 7 foi colocada numa ampola de vidro de 1/2 dram. Um volume igual do solvente orgânico indicado foi adicionado e a mistura fortemente agitada durante um curto período de tempo. 20 ul da termolisina solúvel (100 mg/ml) foram diluídos em 80 ul dum tampão Tris 0,015 M pH 7,0 numa ampola de vidro de 1/2 dram. Um volume de 100 ul do solvente orgânico foi então adicionado à solução protei

Wifann

ca e esta foi, depois, agitada fortemente durante um curto espaço de tempo. A enzima CLEC e a enzima solúvel foram então incubadas em presença do solvente orgânico durante uma hora a 40°C. Após a incubação, a actividade enzimática foi ensaiada por clivagem do substrato dipeptido FAGLA como descrito.

Pensa-se que baixas concentrações de água desfavorecem a não dobragem dos estados intermédios na condução da desnaturação enzimática. Nas CLECs, esta restrição da mobilidade conformacional é desenvolvida pelos contactos intermoleculares e reticulações entre as moléculas constituintes das enzimas que formam a gelosia de cristal, em vez da quase-ausência de água no meio. Como um resultado, as concentrações do solvente água-orgânico intermediário são prontamente toleradas pelas enzimas quando formuladas como CLECs, algo que previamente não se observava com as enzimas (Ver Tabela 12). Esta descoberta abre um conjunto de novas áreas da química orgânica para exploração usando a catálise enzimática.

Mesmo nos solventes orgânicos praticamente anidros, no entanto, o uso rotineiro de enzimas tem sido dificultado pela sua tendência de formar suspensões mal definidas que são objecto de problemas de agregamento e acumulação. Esta propriedade torna estas preparações inerentemente não atractivas para processos à escala industrial. Contrariamente, as CLECs e as enzimas constituintes da gelosia de cristal, mantêm-se mono-dispersas em todos esses solventes.

Comparação com outros processos de imobilização

Numerosas publicações úteis de processos de imobilização de enzimas têm aparecido na literatura (Maugh, T. H., Science, 223: 474-476 (1984); Tramper, J., Trends in Biotechnology 3: 45-50 (1985)). Nestas revistas, a enzima represen

Wifama

ta sempre uma pequena fracção do volume total da partícula imobilizada, cuja massa é uma substância veicular inerte. A substância veicular aumenta a conduta de meio livre entre o solvente exterior da partícula de enzima imobilizada e as zonas activas da enzima activando os problemas de difusão (Quicho, F. A., e Richards, F. M., Biochemistry 5: 4062-4076 (1967)).

Numa CLEC, a matriz de cristal reticulado desenvolve o seu próprio suporte, eliminando a necessidade duma substância veicular. Como resultado, a concentração da enzima numa CLEC é fechado para o limite de embalagem teórico que pode ser alcançado por moléculas dum dado tamanho, excedendo grandemente as densidades alcançáveis mesmo em soluções concentradas. A CLEC inteira consiste na enzima activa, e portanto, a redução relacionada com a difusão das proporções da reacção enzimática normalmente observada com as enzimas imobilizadas convencionalmente em relação às enzimas em solução é minimizada (Ver Figura 1), pois a conduta de meio livre para o substrato e produto entre a enzima e o solvente livre será grandemente reduzida pelas CLECs (em comparação com as partículas da substância veicular enzimática convencionalmente imobilizada). De forma importante, a enzima constituinte das CLECs é intrinsecamente mono-dispersa, e pode ser recuperada por manipulações simples das partículas da CLEC, tal como filtração, centrifugação ou decantação do solvente.

EXEMPLO 3

Cristalização, reticulação e liofilização da elastase e avaliação das características do produto resultante

Cristalização da elastase

Elastase pancreática liofilizada de suínos (Serva)

foi dissolvida em acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 para uma concentração de 5 mg/ml (p/v) à temperatura ambiente. Cristais de elastase sob a forma de varas tornaram-se visíveis ao fim de 10 minutos de dissolução completa da proteína. A solução de cristalização foi transferida para 4°C e a cristalização foi completada durante a noite. Os cristais foram recuperados por centrifugação como previamente se descreveu.

Reticulação dos cristais de elastase

Um volume de 200 ul de cristais de elastase foi adicionado a 1,3 ml duma solução de glutaraldeído a 5,77% e acetato de sódio 1,5 M pH 5,0. Os cristais foram reticulados durante uma hora com agitação suave (placa de agitação). Após a reticulação os cristais foram lavados três vezes com volume de 15 ml de Tris 0,2 M pH 8,0. A elastase CLEC foi liofilizada como descrito no Exemplo 2.

Actividade enzimática da elastase CLEC e solúvel

A actividade catalítica da elastase CLEC e solúvel foi ensaiada por espectrofotometria por medição da hidrólise do substrato succinil-(Ala)-p-nitroanilida (Bachem) (Bieth, et al., Biochem. Med. 11: 350-357 (1974)) (Tabela 13 Figura 5). A clivagem foi monitorizada pelo aumento de absorvância a 410 nm. A concentração inicial do substrato foi de 2×10^{-4} . A concentração de enzima foi de $2,8 \times 10^{-7}$ M. A enzima CLEC ou a solúvel foi adicionadas a um volume reacção de 5 ml que compreendia o substrato em Tris 0,2 M pH 8,0. Tal como descrito anteriormente a enzima CLEC foi removida a partir da mistura de reacção antes da medição da absorção.

TABELA 13 - Actividade de Elastase

Tempo (min.)	Absorvância a 400 nm	
	CLEC	Enzima solúvel

TABELA 13 - Actividade de Elastase

	Tempo (min.)	Absorvância a 400 nm	
		CLEC	Enzima solúvel
1	0,0	0,000	0,000
2	0,5	0,103	0,205
3	1,0	0,195	0,390
4	2,0	0,366	0,672
5	3,0	0,523	0,923
6	4,0	0,657	1,098
7	5,0	0,780	1,227
8	6,0	0,888	1,326
9	7,0	0,974	1,393
10	10,0	1,170	1,512
11	15,0	1,365	1,586

Resistência à protólise exogena

A avaliação da resistência de elastase CLEC à acção da protease foi realizada sob condições idênticas às descritas para a termolisina (Exemplo 2). A actividade das enzimas CLEC e solúvel, após a incubação com a protease, foi ensaiada por hidrólise do substrato nitroanilida como acima descrito (Tabela 14 e Figura 6).

TABELA 14 - Resistência de Elastase à Protólise

	Tempo	% Actividade Máxima	
		CLEC	Enzima solúvel
1	0,0	100,0	100,0
2	10,0		53,0
3	20,0		32,0
4	30,0	101,0	18,0
5	45,0		11,0

W. J. J. J.

TABELA 14 (Cont.) - Resistência de Elastase à Protólise

	Tempo	% Actividade Máxima	
		CLEC	Enzima solúvel
6	60,0	102,0	8,0
7	120,0	101,0	3,0
8	180,0	103,0	2,0

EXEMPLO 4

Cristalização, reticulação e liofilização da esterase e avaliação das características do produto resultante

Cristalização da esterase

Tal como aqui é revelado, dissolveram-se 30 mg/ml duma suspensão de sulfato de amónia da esterase de fígado de porco (Fluka) em acetato de cálcio 0,25 M pH 5,6 à temperatura ambiente. Os cristais esterase foram visíveis alguns minutos depois da adição da solução de acetato de cálcio. A solução de cristalização foi deixada em repouso à temperatura ambiente e a cristalização foi completada durante a noite. Os cristais foram recuperados por centrifugação tal como foi anteriormente descrito no Exemplo 2.

Reticulação dos cristais de esterase

Tal como aqui é revelado, um volume de 300 μ l de cristais de esterase foram adicionados a 5 ml duma solução de glutaraldeído 12,5% e acetato de sódio 0,5 M pH 5,5. Os cristais foram reticulados durante uma hora com agitação suave (placa de agitação). Após a reticulação os cristais foram lavados três vezes com volumes de 15 ml de acetato de cálcio 0,5 M, pH 6,3. A esterase CLEC foi liofilizada tal como se descreveu acima no Exemplo 2.

Wifama

Actividade enzimática das esterases CLEC e solúvel

A actividade catalítica das esterases CLEC e solúvel foram ensaiadas espectrofotometricamente por monitorização da hidrólise do substrato acetato de p-nitrofenilo (Fluka) (Tabela 15 e Figura 7). A clivagem foi monitorizada por aumento da absorção a 400 nm. A concentração do substrato inicial foi de 0,001%. A concentração da enzima foi de 1×10^{-8} M. A enzima CLEC ou a enzima solúvel foi adicionada a um volume reaccional de 5 ml que compreendia o substrato de acetato de cálcio 0,25 M pH 6,3. Tal como descrito previamente no Exemplo 2, a enzima CLEC foi removida a partir da mistura de reacção por centrifugação antes da medição da absorção.

TABELA 15 - Actividade da Esterase

		Absorvância a 400 nm	
	Tempo (min.)	CLEC	Enzima solúvel
1	0,0	0,000	0,000
2	0,5	0,770	0,252
3	1,0	0,128	0,297
4	2,0	0,208	0,337
5	3,0	0,260	0,346
6	5,0	0,324	0,353
7	7,0	0,353	0,359
8	10,0	0,369	0,368

Resistência à proteólise exógena

A avaliação da resistência da esterase CLEC em relação à acção da protease foi também realizada sob condições idênticas às descritas para a termolisina (Exemplo 2). A actividade da enzima CLEC e da solúvel, após a incubação com a protease, foi ensaiada por hidrólise do substrato de acetato p-nitrofenilo como acima se descreveu (Tabela 16 e Figura 8).

TABELA 16 - Resistência de Esterase à Protólise

	Tempo (min.)	% Actividade Máxima	
		CLEC	Enzima solúvel
1	0,0	100,0	100,0
2	10,0		68,0
3	20,0		47,0
4	30,0	99,0	25,0
5	45,0		20,0
6	60,0	97,0	16,0
7	120,0	94,0	10,0
8	180,0	91,0	6,0

EXEMPLO 5

Cristalização, reticulação e liofilização da lipase e avaliação das características do produto resultante

Cristalização da lipase

Tal como aqui é desvendado, a enzima lipase (Geotrichum candidum) foi cristalizada por difusão de vapor a partir duma solução aquosa de 20 mg/ml da proteína em Tris 50 mM pH 7 compreendendo sulfato de amónia a 8%. Os cristais bipiramidais tornaram-se visíveis 20 a 30 dias após a incubação à temperatura ambiente. Os cristais foram removidos por centrifugação, como anteriormente descrito no Exemplo 2.

Reticulação dos cristais de lipase

Tal como aqui se descreve, os cristais de lipase foram adicionados a uma solução de glutaraldeído a 12,5% e Tris 50 mM pH 5,6. Os cristais foram reticulados durante uma hora. Após a reticulação dos cristais foram lavados três vezes com volumes de 15 ml de Tris 50 mM pH 7,0. A lipase CLEC foi liofilizada, tal como previamente foi descrito no Exemplo 2.

Actividade enzimática da lipase solúvel e da lipase CLEC

As actividades catalíticas das lipases solúvel e CLEC foram ensaiadas por espectrofotometria por monitorização da hidrólise do substrato acetato de p-nitrofenilo (Tabela 17 e Figura 9). A clivagem foi monitorizada por aumento da absorção a 400 nm. A concentração do substrato inicial foi de 0,005%. A concentração da enzima foi de $1,5 \times 10^{-8}$ M. A enzima CLEC ou a enzima solúvel foram adicionadas a um volume reaccional que compreende o substrato em Tris 0,2 M pH 7,0 à temperatura ambiente. Tal como descrito previamente no Exemplo 2, a enzima CLEC foi removida da mistura de reacção por centrifugação antes da medição da absorção.

TABELA 17 - Actividade de Lipase

		Absorvância 400 nm	
	Tempo (min.)	CLEC	Enzima solúvel
1	0,0	0,000	0,000
2	1,0	0,013	0,021
3	5,0	0,094	0,116
4	10,0	0,164	0,186
5	15,0	0,248	0,258
6	30,0	0,346	0,357
7	45,0	0,407	0,420
8	60,0	0,461	0,459
9	90,0	0,497	0,502

EXEMPLO 6

Cristalização, reticulação e liofilização da lisozima e avaliação das características do produto resultante

Cristalização da lisozima

Seguindo-se o processo de Blake, C. C. F. et al.,

W. J. J. J.

Nature 196: 1173 (1962) 200 mg de lisozima de clara de ovo (Boehringer Mannheim) foram dissolvidos em 2,5 ml dum tampão de acetato de sódio 0,04 M pH 4,7 à temperatura ambiente. Após dissolução da proteína, foram adicionados 2,5 ml de cloreto de sódio a 10% cuidadosamente gota a gota à solução de lisozima com agitação. Permitiu-se que a solução de cristalização repousasse durante a noite à temperatura ambiente, e a cristalização foi completada em 48 horas. Os cristais foram recuperados por centrifugação, tal como se descreveu acima no Exemplo 2.

Reticulação dos cristais de lipase

Tal como aqui é descrito, um volume de 500 μ l dos cristais de lisozima foi adicionado a 10 ml de gluteraldeído a 24% e Tris 50 mM pH 5,6 compreendendo cloreto de sódio a 20%. Os cristais foram reticulados durante 20 minutos com agitação suave (placa de agitação). Após a reticulação os cristais foram lavados três vezes com volumes de 50 ml de acetato de cálcio 20 mM e cloreto de potássio 50 mM, pH 5,3. A lisozima CLEC foi liofilizada, tal como previamente foi descrito no Exemplo 2.

Actividade enzimática da lisozima solúvel e da lisozima CLEC

As actividades catalíticas das lisozimas solúvel e CLEC foram ensaiadas por medição da proporção da hidrólise do substrato 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitriosido (Fluka) (Yang, Y. e Hamaguchi, K., J. Biochem. 8: 1003-1014 (1980) (Tabela 18 e Figura 10). A libertação de 4-metilumbeliferona foi seguida fluorimetricamente (Perkin Elmer Model LS-50). A concentração do substrato inicial foi de $1,42 \times 10^{-3}$. A concentração da enzima foi de 3×10^{-7} M. A enzima CLEC ou a enzima solúvel foram adicionadas a um volume reacional de 2 ml que compreendia o substrato em acetato de cálcio 20 mM e

Wifama

cloreto de potássio 50 mM, pH 5,3 a 42°C. A quantidade de 4-metilumeliferona foi determinada fluorimetricamente por medição da intensidade de fluorescência a 450 nm com a excitação a 360 nm. A espessura estreita para ambas, excitação e emissão, foi de 10 nm. Tal como descrito previamente no Exemplo 2, a enzima CLEC foi removida da mistura de reacção por centrifugação antes da medição da fluorescência.

TABELA 18 - Actividade de Lişozima

	Tempo (min.)	Fluorescência	
		CLEC	Enzima solúvel
1	0,000	0,000	0,000
2	10,000	4,400	18,900
3	30,000	10,500	29,400
4	60,000	27,500	44,800
5	90,000	33,800	51,500
6	120,000	45,900	59,800

EXEMPLO 7

Cristalização, reticulação e liofilização da asparaginase e avaliação das características do produto resultante

Cristalização da asparaginase

Como uma modificação da técnica descrita por Grabner et al. (Memória Descritiva da Patente Americana Nº. 3.664.926 (1972) 25 mg de asparaginase liofilizada (Worthington) foram dissolvidos em 500 ul dum tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,2. A solução foi arrefecida a 4°C e o pH ajustado para 5,0 com ácido acético 1 M. Etanol frio (-20°C) foi então cuidadosamente adicionado gota a gota à solução de asparaginase para uma concentração final de 33%. A solução foi incubada a 4°C. A cristalização foi completada em 48 horas.

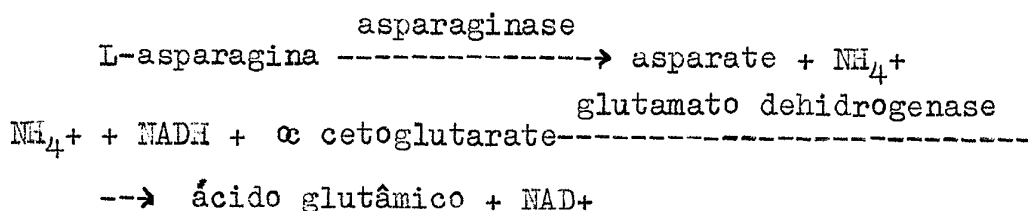
Os cristais foram recuperados por centrifugação, tal como se descreveu anteriormente.

Reticulação dos cristais de asparaginase

Tal como aqui é desvendado, os cristais de asparaginase foram reticulados numa solução de glutaraldeído a 7,5% num tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5,6. Após a reticulação dos cristais foram lavados 5 vezes com volumes de 15 ml de Tris 50 mM, pH 7,0. A asparaginase CLEC foi liofilizada, tal como previamente foi descrito no Exemplo 2.

Actividade enzimática da asparaginase solúvel e da asparaginase CLEC

As actividades catalíticas das asparaginases solúvel e CLEC foram ensaiadas espectrofotometricamente por medição da evolução do ião amónio na reacção enzimática acoplada abaixo descrita (todos os reagentes foram fornecidos pela Boehringer Mannheim) Tabela 19 e Figura 11).



A oxidação do NADH foi medida pela diminuição de adsorção a 340 nm. A concentração inicial de NADH foi de 1,4 mg/ml. A concentração da asparaginase foi de 10^{-3} M. A concentração da alfa cetoglutarato foi de 10^{-4} M. A concentração do glutamato desidrogenase foi de 10^{-7} M. A concentração da asparaginase foi de $2,3 \times 10^{-8}$ M. Tal como descrito previamente no Exemplo 2, a enzima CLEC foi removida da mistura reaccional por centrifugação antes da medição da absorvância.

Li-fan

TABELA 19 - Actividade de Asparaginase

Absorvância a 340 nm			
	Tempo (min.)	CLEC	Enzima solúvel
1	0,0	1,000	1,000
2	1,0	0,867	0,825
3	3,0	0,739	0,684
4	5,0	0,603	0,538
5	10,0	0,502	0,406
6	15,0	0,449	0,338
7	30,0	0,328	0,199
8	45,0	0,211	0,187

Equivalentes

Os peritos na técnica reconhecerão ou estarão aptos a adaptar, usando mais do que a experimentação de rotina, muitos equivalentes a este material específico e componentes aqui descritos. Tais equivalentes entendem-se como abrangidos pelo espírito das reivindicações que se seguem.



REIVINDICAÇÕES:

1^a. Processo para a realização de processos catalisados por enzimas com utilização de cristais reticulados como forma de imobilização de enzimas para a preparação de produtos seleccionados, caracterizado pelo facto de compreender

a) combinar-se pelo menos um substrato apropriadamente escolhido com pelo menos uma enzima que actua sobre o substrato e está sob a forma de um cristal da enzima imobilizado reticulado; e

b) manter-se a combinação produzida na operação a) sob as condições apropriadas para a enzima actuar sobre o substrato e originar o produto pretendido.

2^a. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o produto seleccionado ser escolhido do grupo que consiste em péptidos, lípidos, moléculas organicas quirais e hidratos de carbono.

3^a. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o cristal reticulado de enzima imobilizada ter um tamanho aproximadamente igual a 10^{-1} mm.

4^a. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de as condições existentes na fase b) serem prejudiciais para a função eficiente da enzima que não se encontra sob a forma dum cristal de enzima imobilizada reticulada.

5^a. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de as condições de realização da

fase b) serem escolhidas do grupo que consiste em temperatura elevada, pH baixo, pH alto, dissolventes organicos mistos aquosos/organicos e condições quase anidras.

6^a. Processo para a realização de processos catalisados por enzimas com utilização de cristais reticulados como forma de imobilização das enzimas para a preparação de produtos seleccionados, caracterizado pelo facto de compreender

a) combinar-se dois substratos apropriadamente escolhidos com pelo menos uma enzima que actua sobre pelo menos num dos substratos escolhidos e está sob a forma de um cristal da enzima imobilizado reticulada; e

b) manter-se a combinação produzida na operação a) sob as condições apropriadas para a enzima actuar sobre pelo menos um dos substratos e originar o produto pretendido.

7^a. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de o produto pretendido ser escolhido do grupo que consiste em péptidos, lípidos, moléculas organicas quirais e hidratos de carbono.

8^a. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de o cristal reticulado de enzima imobilizada ter um tamanho aproximadamente igual a 10^{-1} mm.

9^a. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de as condições existentes na fase b) serem prejudiciais para a função eficiente da enzima que não se encontra sob a forma dum cristal de enzima imobilizada reticulada.

10^a. Processo de acodo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de as condições de realização da fase b) serem escolhidas do grupo que consiste em temperatura elevada, pH baixo, pH alto, dissolventes organicos mistos aquosos/organicos e condições quase anidras.

11^a. Processo catalisado por enzimas para a preparação dum produto seleccionado no seio dum dissolvente organico, caracterizado pelo facto de compreender

a) combinar-se pelo menos um substrato apropriadamente escolhido; com pelo menos uma enzima que actua sobre o substrato e está sob a forma de um cristal da enzima imobilizado reticulada; e com o dissolvente organico; e

b) manter-se a combinação produzida na operação a) sob as condições apropriadas para a enzima actuar sobre o substrato e originar o produto pretendido.

12^a. Processo catalisado por enzimas para a preparação de um produto seleccionado, caracterizado pelo facto de compreender combinar-se um substrato apropriadamente escolhido com um cristal de enzima imobilizado reticulado que actua sobre o substrato apropriadamente escolhido, em condições apropriadas para os cristrais de enzima imobilizada reticulada actuarem sobre o substrato apropriadamente escolhido, alterando-o e originar o produto pretendido.

13^a. Processo para a preparação de éster de l-metilo de N-L- --aspartil-L-fenilalanina (aspartame), caracterizado pelo facto de compreender as operações que consistem em:

a) combinar-se os dois péptidos com cristais de termolisina imobilizada reticulados, tendo um dos péptidos a fórmula

Wifama

Z-L-Asp

e tendo o segundo péptido a fórmula

DL-Phe-OMe

sob condições apropriadas para a condensação dos dois péptidos por meio de cristais de enzima imobilizada reticulada, originando um dipéptido parcialmente protegido da fórmula

Z-L-Asp-L-Phe-OMe

na qual

Z representa um grupo benziloxi e

b) eliminar-se o grupo benziloxycarbonilo e obter-se aspartame.

14^a. Processo para imobilizar uma enzima e reter a sua actividade, caracterizado pelo facto de se empregar a enzima como um cristal e se reticular o cristal de maneira a obter-se um cristal de enzima imobilizada reticulado com um tamanho aproximadamente igual a 10^{-1} mm.

15^a. Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo facto de os cristais de enzimas serem escolhidos de termolisina, lipases, elastases, esterases, lisózymas e asparaginase.

16^a. Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo facto de adicionalmente compreender a liofilização dos cristais imobilizados reticulados.

17^a. Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo facto de a enzima ser escolhida do grupo que consiste em termolisina, lipases, esterases, elastases, lisózymas e asparaginase.

18^a. Processo para imobilizar a termolisina e reter a sua actividade, caracterizado pelo facto de se empregar

cristais de termolisina e se reticular os cristais de termolisina, de forma a obter cristais de termolisina imobilizados e reticulados com um tamanho aproximadamente igual a 10^{-1} mm.

19^a. Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo facto de compreender adicionalmente a liofilização dos cristais de enzima imobilizados reticulados produzidos.

20^a. Dispositivo que compreende uma enzima sob a forma de cristais de enzima imobilizados reticulados e meios de retenção para os cristais de enzima imobilizados reticulados, caracterizado pelo facto de os meios de retenção permitirem o contacto entre os cristais de enzima imobilizados reticulados e um substrato sobre o qual a enzima actua, estando o substrato presente num fluido.

21^a. Dispositivo biossensor para detectar a presença dum produto de interesse a analisar num fluido, caracterizado pelo facto de compreender

a) um conjunto de cristais de enzima imobilizados reticulados, em que a enzima presente actua sobre o produto de interesse a analisar ou sobre um reagente duma reacção em que o produto de interesse a analisar participa; e

b) meios de retenção para os cristais de enzima imobilizados reticulados que permitem o contacto entre os cristais de enzima imobilizados reticulados e um fluido que contém:

1) o produto que se pretende analisar sobre o qual a enzima actua, encontrando-se o referido produto no seio de um fluido; ou

2) um reagente duma reacção em que o produto a



analisar participa, encontrando-se o mencionado reagente presente no fluido.

22^a. Dispositivo biossensor de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo facto de compreender ainda meios detectores.

23^a. Dispositivo biossensor, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo facto de ser apropriado para detectar a presença dum produto escolhido do grupo que consiste em glucose, creatinina, ureia, lactato, glucose-6-fosfato, sacarose, trifosfato de adenosina (ATP), etanol, ácido acético, ácido fórmico, colesterol, ácido úrico, ácido N-{4-[[(2,4-diamino-6-pteridinil)-metil]-metilamino]-benzoil}-L-glutámico ("metotrexato"), dióxido de carbono, aminoácidos, fosfatos, penicilina, nitratos, nitritos, sulfatos e succinato.

24^a. Dispositivo biossensor para detectar a presença dum produto que interessa analisar num fluido, caracterizado pelo facto de compreender

a) cristais de luciferase imobilizados reticulados, que actuam sobre o produto a analisar ou sobre um produto de uma reacção em que ele participa; e

b) meios de retenção para os cristais de luciferase imobilizados reticulados que permitem o contacto entre os cristais de luciferase imobilizados reticulados e um fluido que contém

1) o produto a analisar sobre o qual a luciferase actua ou

2) o produto duma reacção em que o referido produto a analisar participa.

Américo da Silva Carvalho

90

25^a. Dispositivo extracorporal para modificar o teor de um componente dum fluido corporal, caracterizado pelo facto de compreender

a) cristais de enzima imobilizados reticulados que actuam sobre o referido componente ou sobre um reagente numa reacção em que esse componente participa; e

b) meios de retenção para os cristais de enzima imobilizados reticulados que permitem o contacto entre os referidos cristais de enzima imobilizados e

1) o componente existente no fluido sobre o qual o enzima actua ou

2) o produto de uma reacção em que o componente participa e se encontra presente no fluido.

26^a. Dispositivo extracorporal de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo facto de o componente do fluido cujo teor se pretende modificar ser escolhido do grupo que consiste em asparagina, heparina, bilirrubina, metotrexato, aminoácidos, ureia e amoníaco.

27^a. Dispositivo útil para a obtenção dum produto escolhido, caracterizado pelo facto de compreender uma enzima sob a forma de cristal de enzima imobilizado reticulado e meios de retenção dos cristais de enzima imobilizados reticulados.

Lisboa, 2 de Agosto de 1991

O Agente Oficial da propriedade Industrial

Américo da Silva Carvalho

Américo da Silva Carvalho

Agente Oficial de Propriedade Industrial

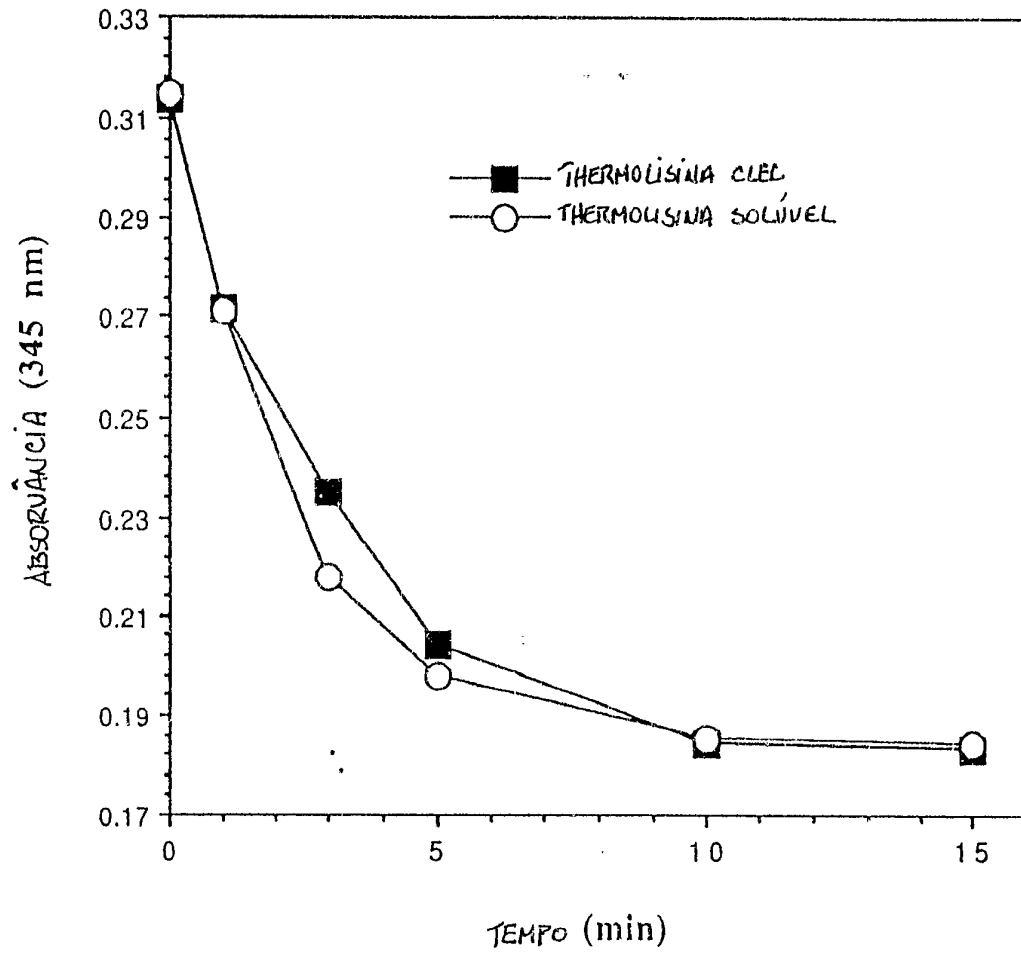
Rua Marquês de Fronteira, N.º 127 - 2.º

1000 LISBOA Tele. 3877373-3877453

DESENHOS 11-Nº1

Figure 1

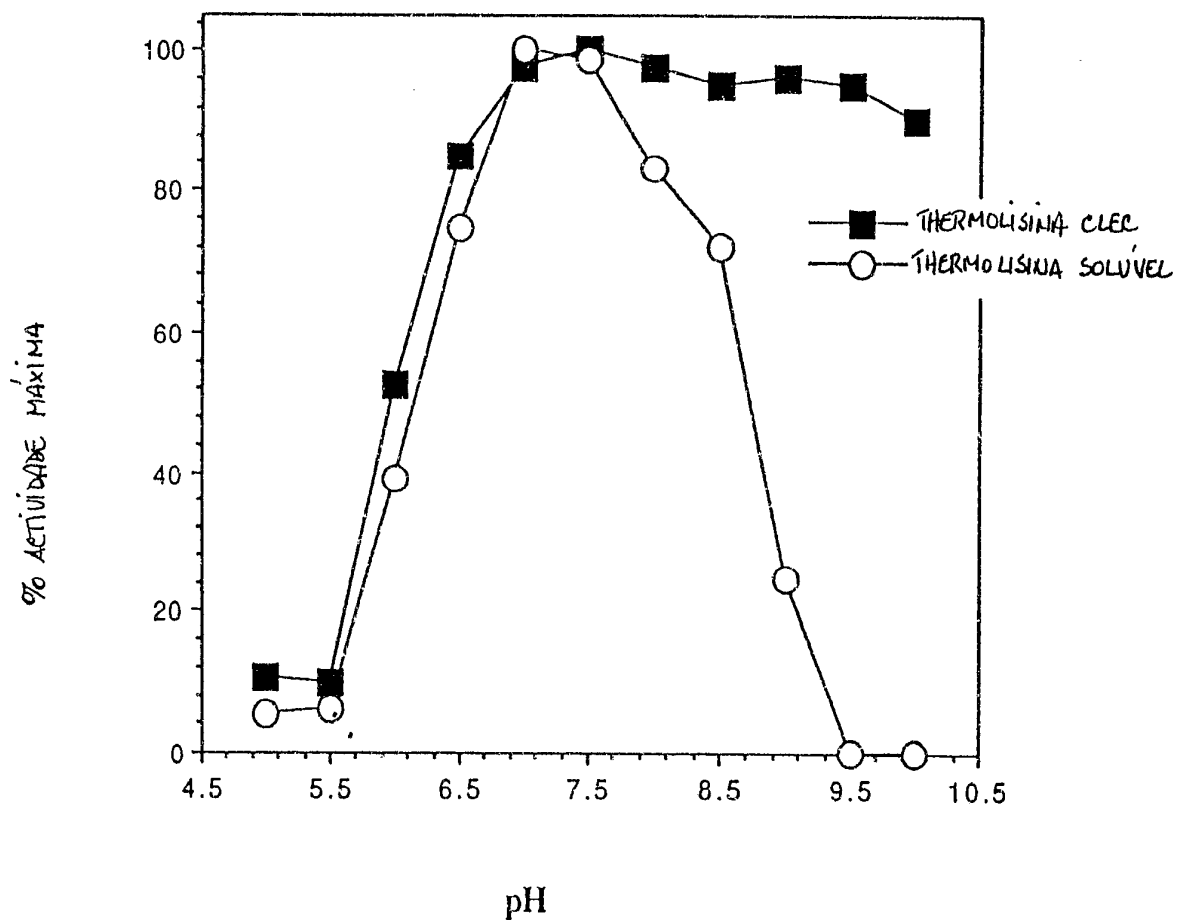
Wifama



DESENHOS 11-Nº2

Figura

Figure 2

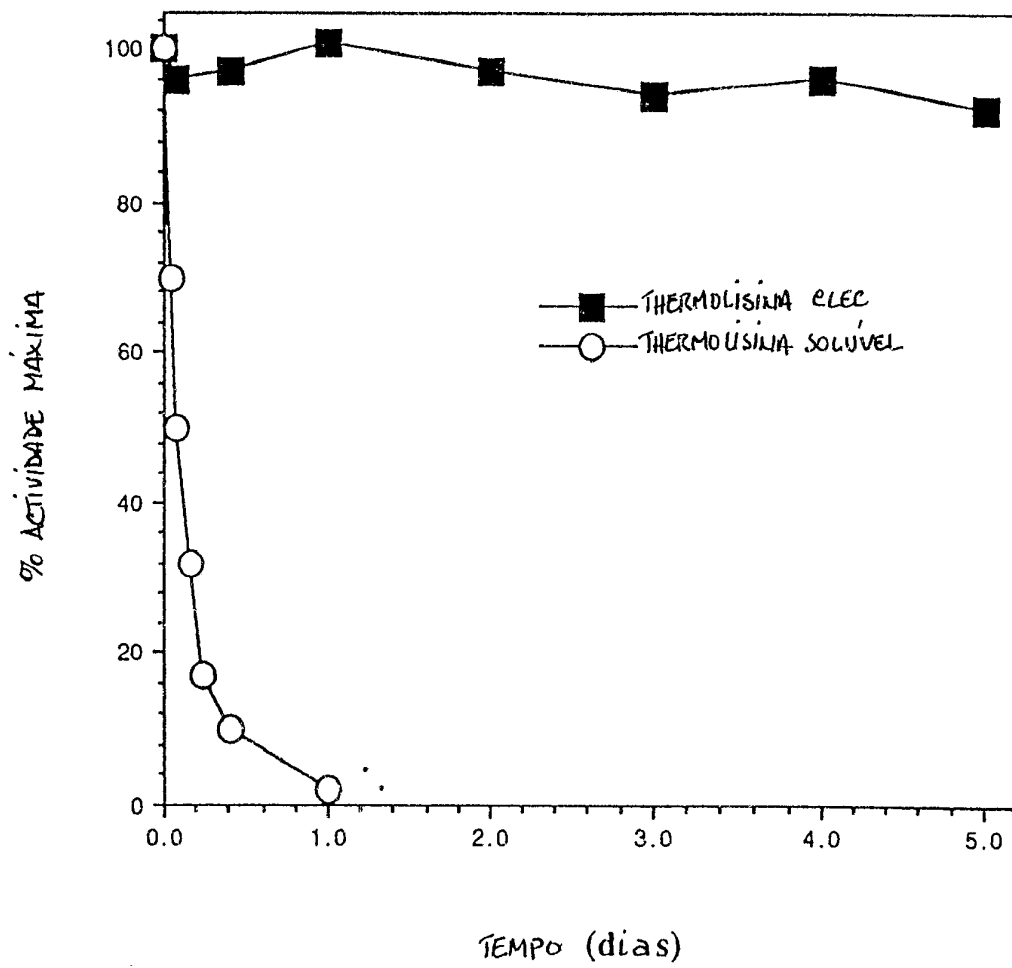


16 to 2000 1. 0 1. 0 1. 0

DESENHOS 11-Nº 3

Wifama

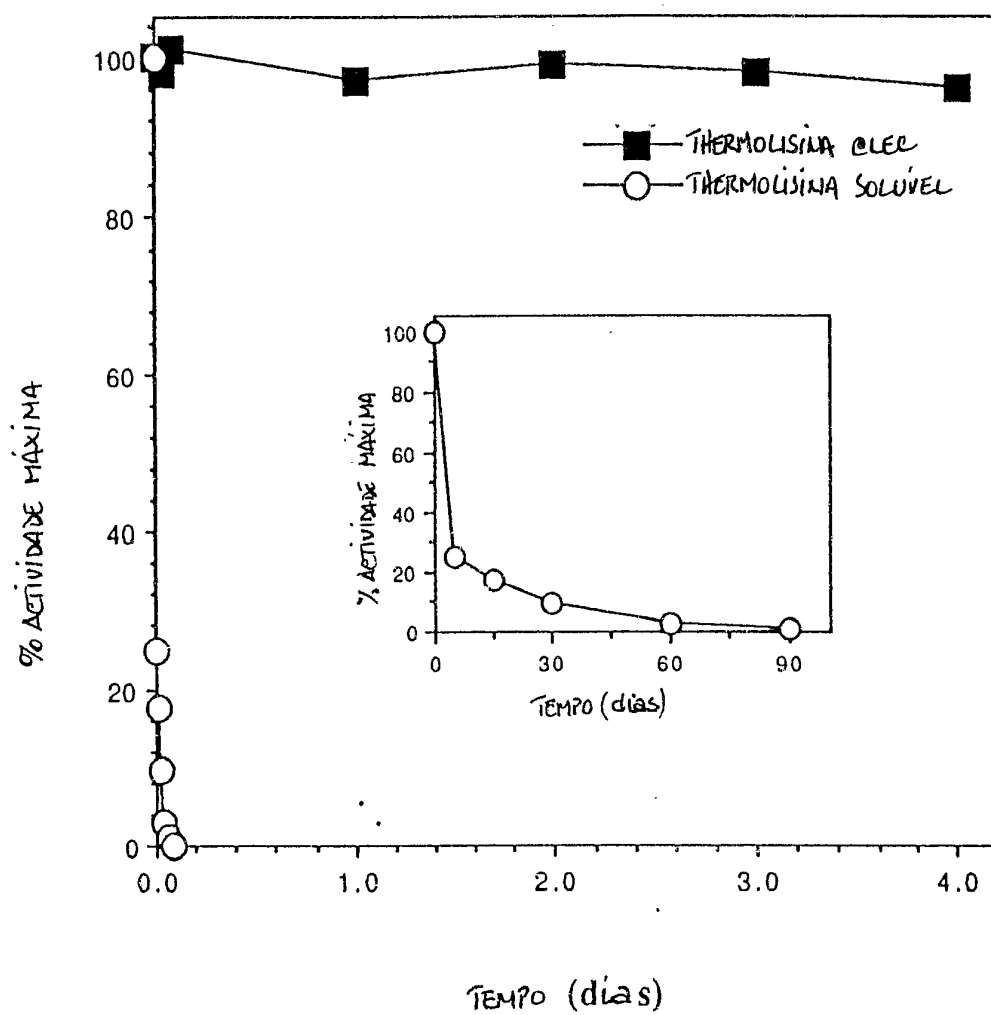
Figure 3



DESENHOS 11 - N° 4

Wifama

Figure 4

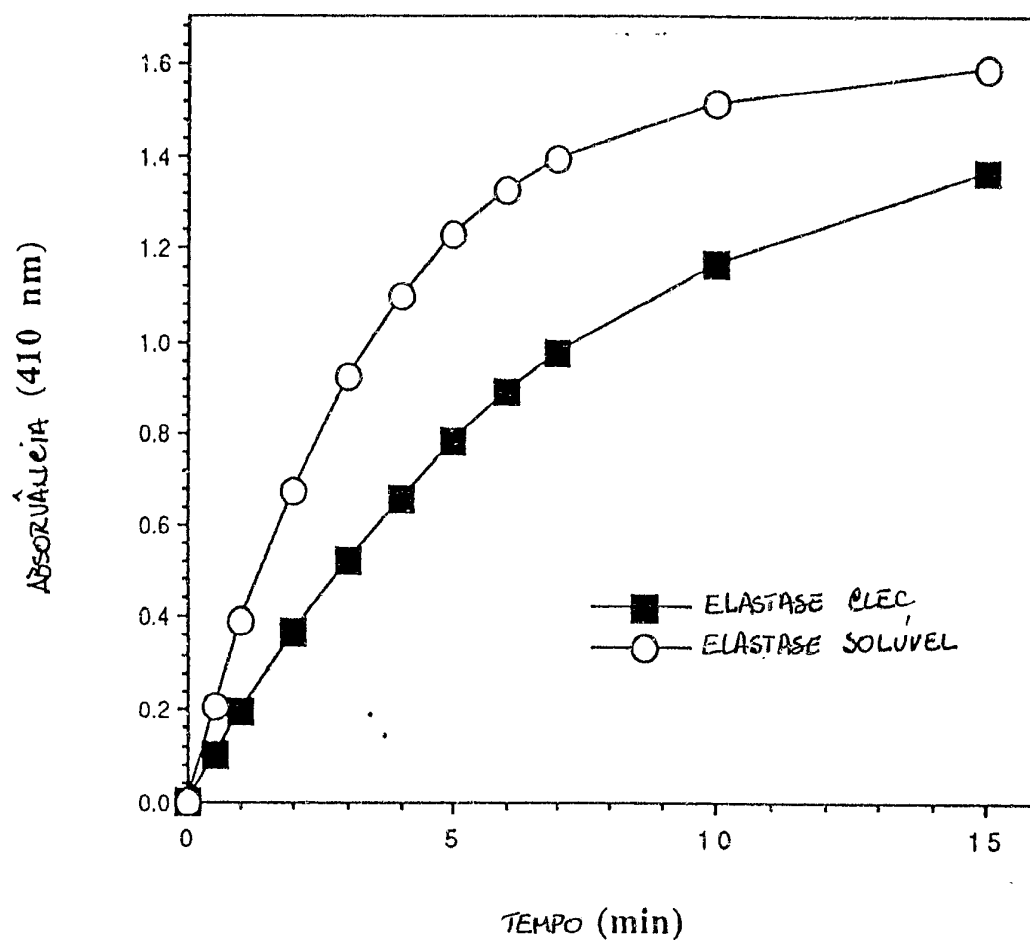


Unit: Pharmaceutical Technology

Desenhos 11-Nº5

Wifredo

Figure 5

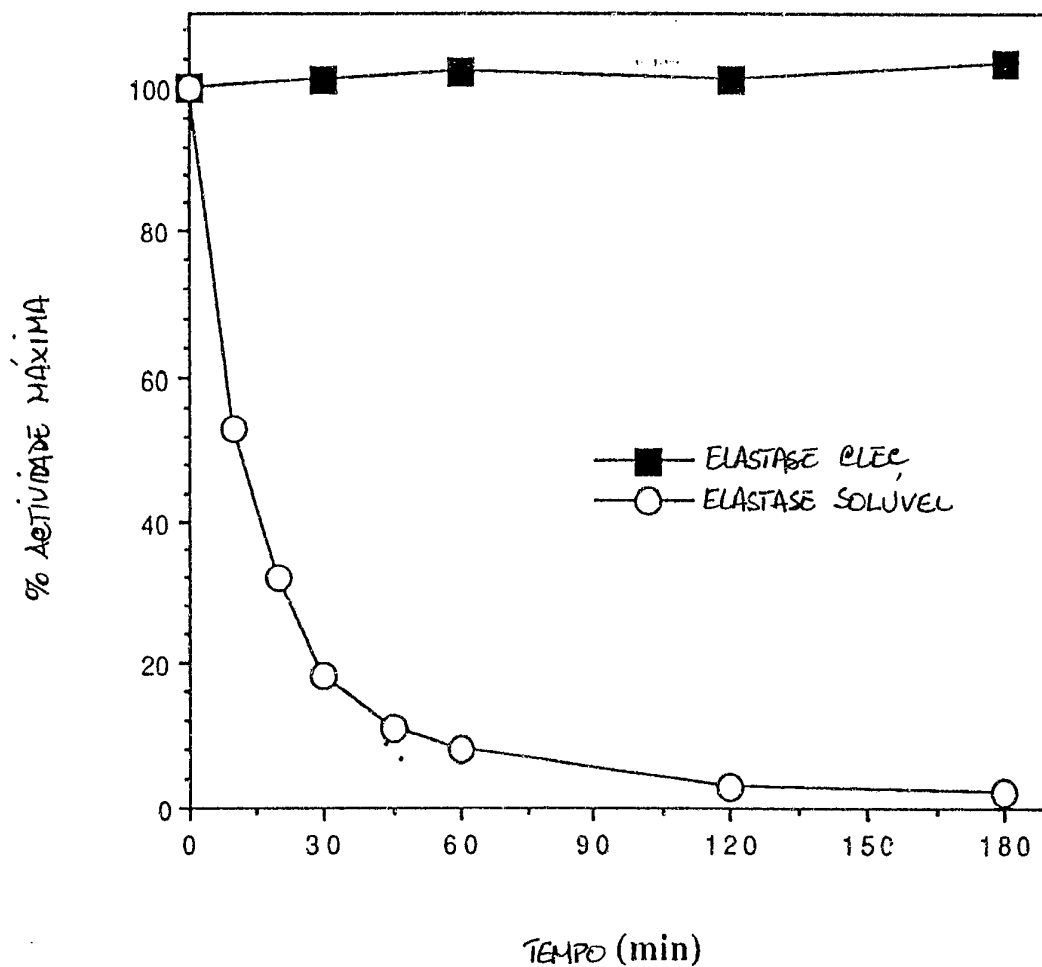


Unit: Absorbance (410 nm) / Time (min)

DESENHOS 11-Nº6

Figure 6

Wifama

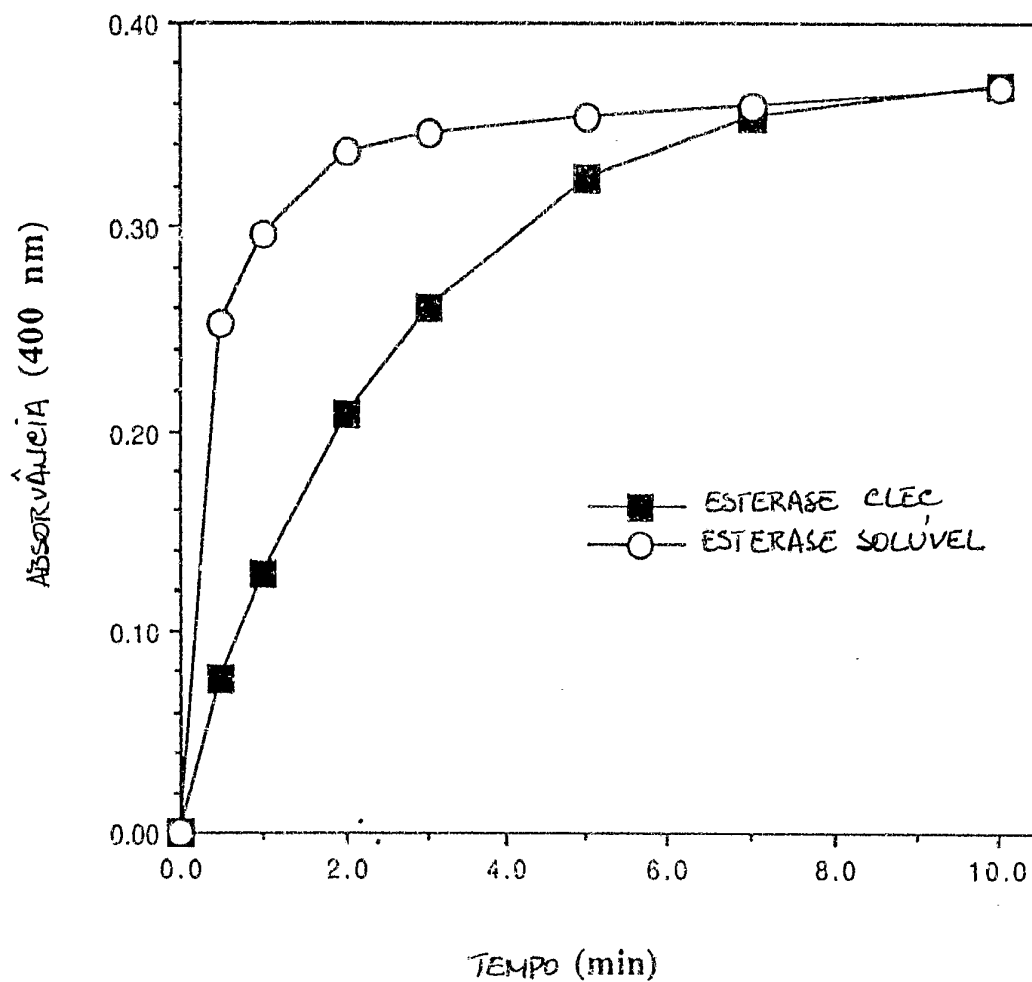


Unit Pharmaceuticals Incorporated

DESENHOS 11-11-7

Wifama

Figure 7

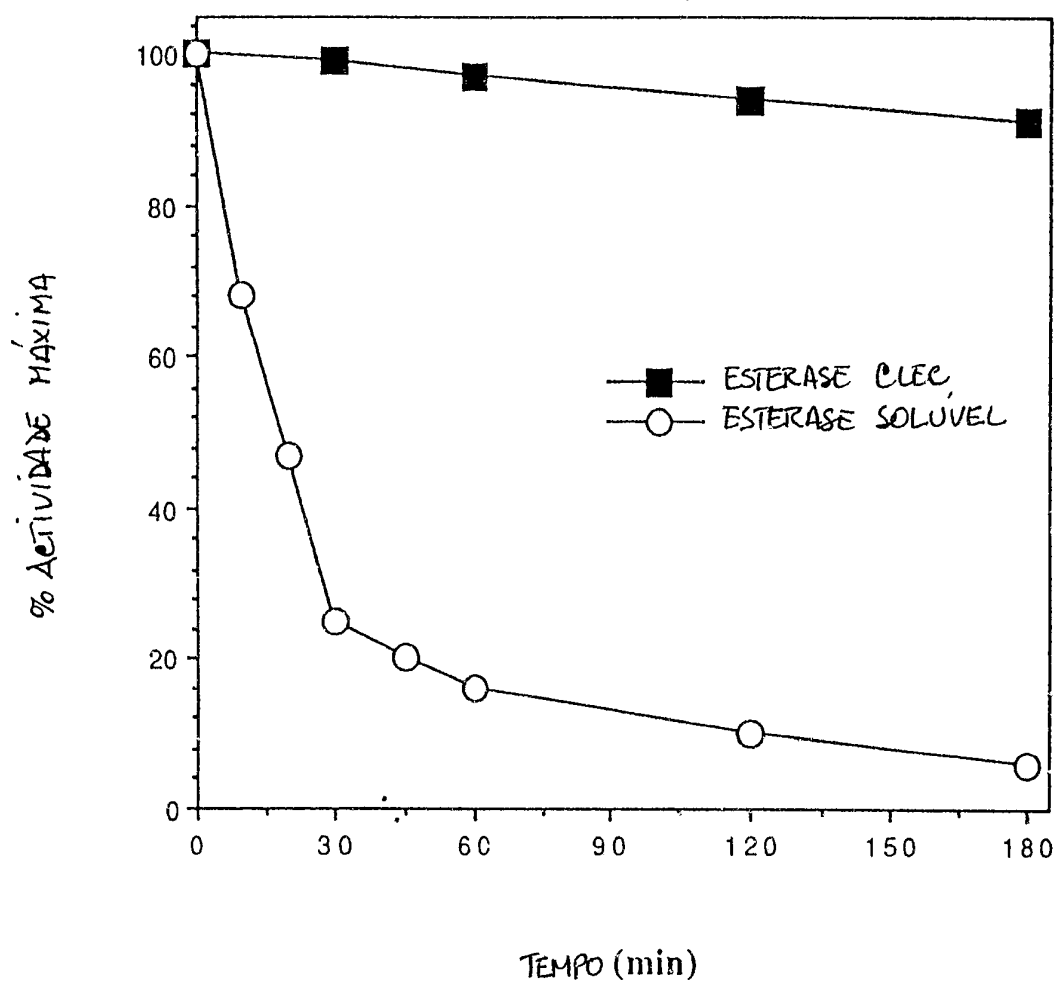


Monte Pharmaceuticals Transcribed

Desenhos 11-Nº8

Figure 8

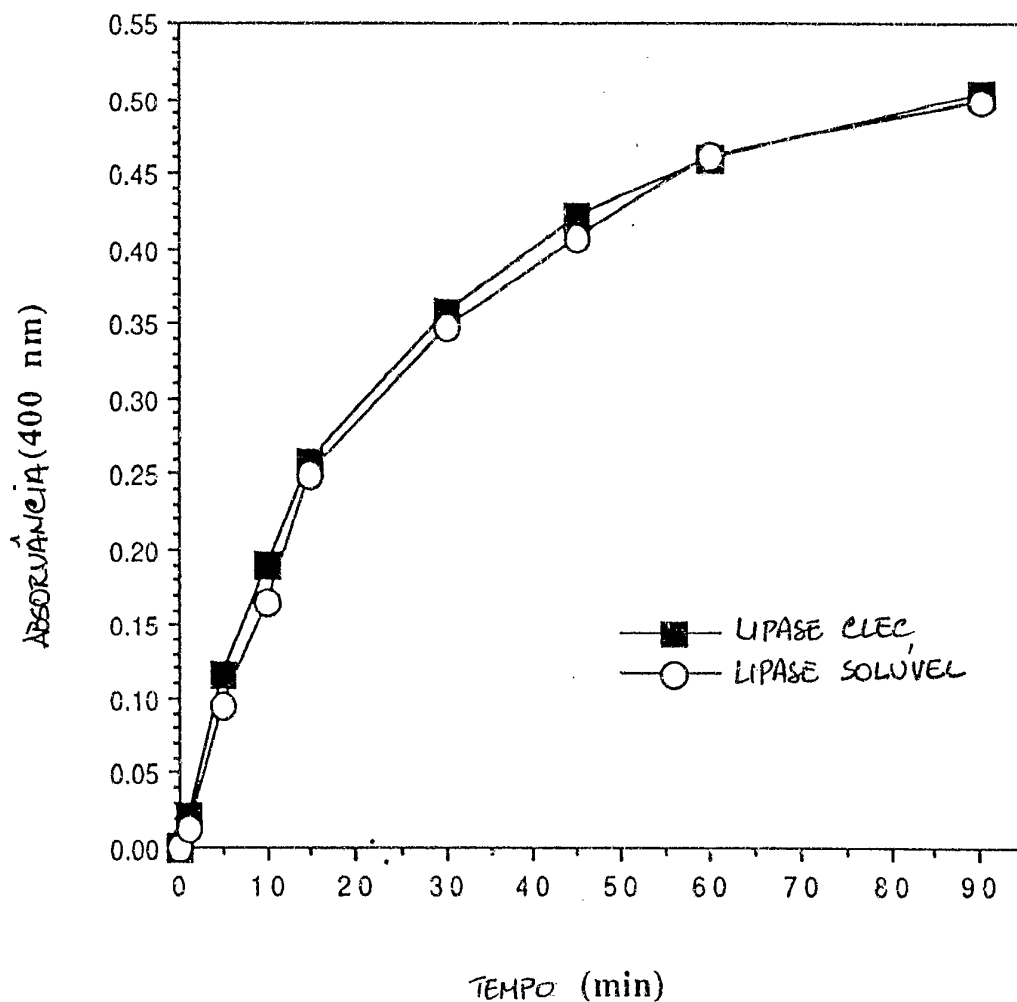
Wifama



Desenhos II - N° 9

Wifann

Figure 9

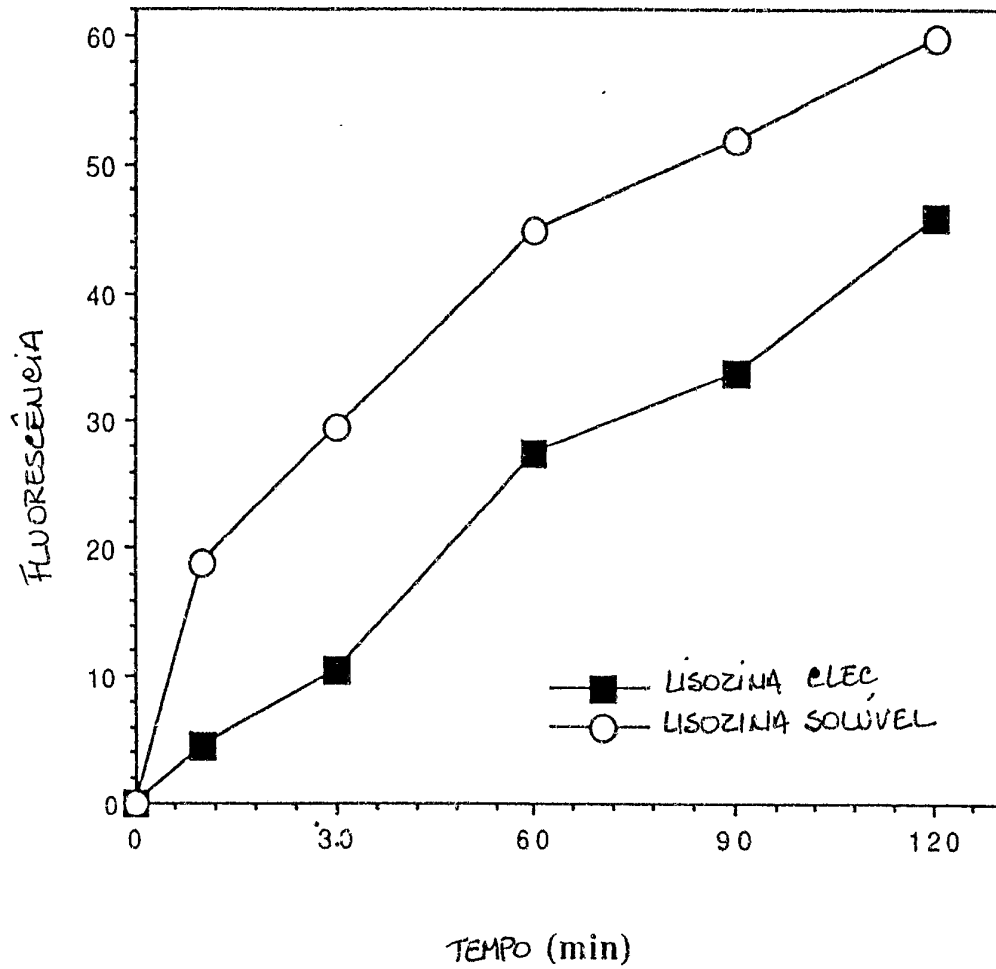


Unit: Absorbance Unit: Time: 90 min

Desenhos 11-Nº10

Wifama

Figure 10

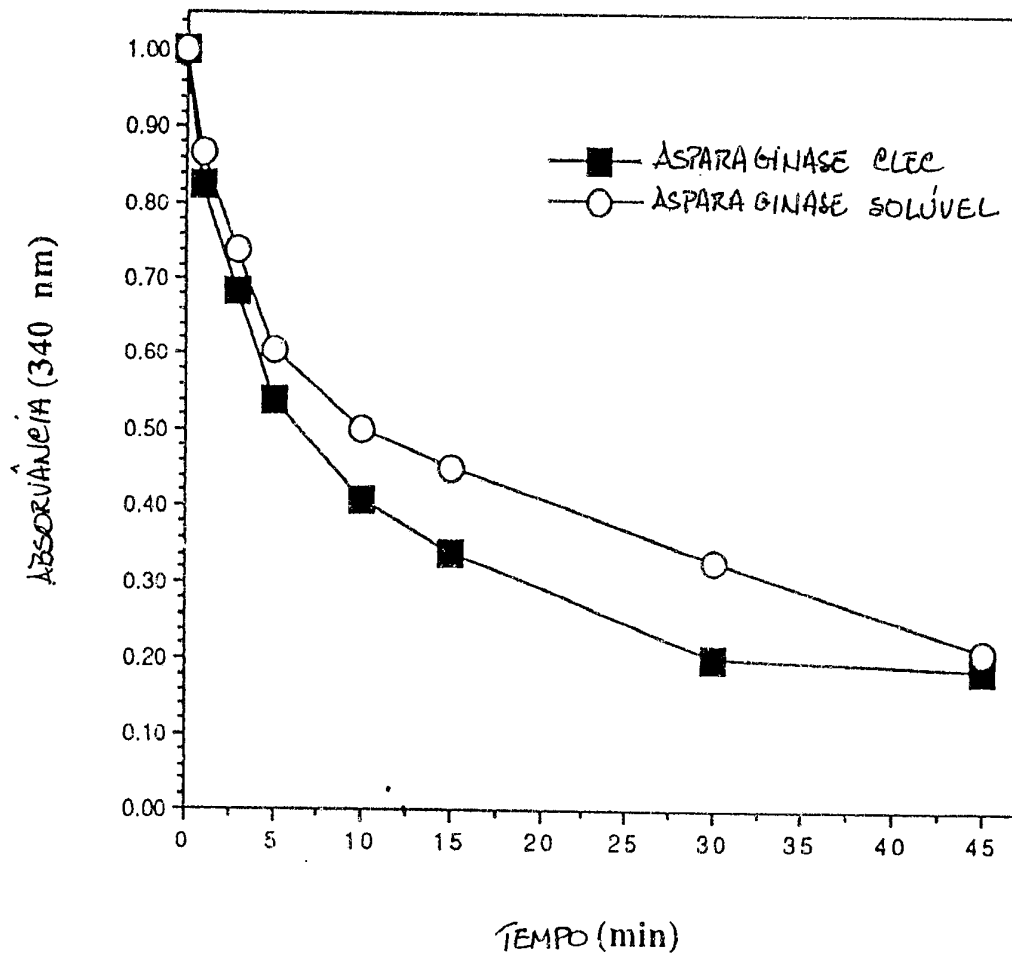


Unit. Pharmaceuticals Incorporated

DESENHOS 11-Nº 11

Figure 11

Wifama



Wifama Pharmaceuticals Incorporated