



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101994900382060
Data Deposito	25/07/1994
Data Pubblicazione	25/01/1996

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	C		

Titolo

FILM ORDINATI LIPIDI-PROTEINE OTTENUTI PER FUNZIONALIZZAZIONE CHIMICA E
PROCEDIMENTO PER LA LORO PREPARAZIONE

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto di invenzione dal titolo:

"Film ordinati lipidi-proteine ottenuti per funzionalizzazione chimica e procedimento per la loro preparazione"

a nome: TECHNOBIOCHIP, CONSORZIO DI RICERCA INDUSTRIALE AVANZATA

Inventore: Antolini , Nicolini Claudio

La presente invenzione concerne film ordinati lipidi-proteine ottenuti per funzionalizzazione chimica e un procedimento per la loro preparazione.

Più in particolare l'invenzione concerne film ordinati lipidi-proteine, in cui l'orientamento delle proteine è ottenuto a mezzo di funzionalizzazione univoca e selettiva di un unico residuo amminoacidico delle proteine che, se necessario, sono a tal scopo modificate chimicamente, anche per mutagenesi sito-specifica. La specificità della reazione tra il lipide e la proteina fa sì che questa risulti orientata rispetto al piano formato dal film lipidico.

L'immobilizzazione di proteine su substrati solidi è estremamente importante sia da un punto di vista cognitivo che applicativo. Infatti la formazione di film misti lipidi-proteine dà informazioni sulle strutture molecolari tipiche delle membrane biologiche, permettendo inoltre lo studio dei processi di trasferimento elettronico che hanno luogo nelle membrane stesse [1-5]. In particolare, se i film misti lipidi-proteine sono anche

ordinati è possibile approfondire i meccanismi che regolano l'assemblaggio bidimensionale delle biomolecole.

Dal punto di vista applicativo la formazione di film proteici consente la costruzione di dispositivi, di dimensioni molecolari, utilizzabili nel campo dei biosensori, delle cromatografia di affinità, delle analisi biomediche [6-8]. Per la realizzazione di dispositivi bioelettronici è necessario che i film proteici siano anche ordinati, affinché le proprietà di trasferimento elettronico siano omogenee per l'intero sistema.

E' possibile ottenere film proteici all'interfaccia aria-acqua mediante le tecnologia di Langmuir-Blodgett (LB) [9] e di Langmuir-Schaefer (LS) [10], ma la loro realizzazione presenta due principali problemi: a) le proteine non sono molecole anfifiliche che naturalmente si dispongono all'interfaccia aria-acqua, ma tendono ad andare in soluzione; b) la tensione superficiale dell'acqua denatura le proteine, poichè le forze responsabili della struttura proteica sono dello stesso ordine di grandezza della tensione superficiale dell'acqua. Per superare questi due ostacoli si rende necessario sia modificare le tecniche di filmazione e deposizione, che "manipolare", per quanto possibile, il campione proteico.

Il problema della perdita di materiale dalla superficie acquosa può essere limitato aumentando la velocità di compressione fino a 3.5 mm/sec, così da impaccare le unità proteiche prima che esse vadano in soluzione, ma è probabile che almeno il 30% della proteina aggiunta vada, pur tuttavia, in soluzione.

La denaturazione può essere limitata dalla velocità di compressione delle barriere, poichè in questo modo viene diminuito il tempo in cui le molecole proteiche si trovano a contatto con la superficie acquosa e sono subito avvicinate le une alle altre. La denaturazione può essere completamente evitata se si diminuisce la tensione superficiale della subfase, preformando un film lipidico all'interfaccia che possa legarsi specificamente o aspecificamente alla proteina [11-12]. Infatti è nota dalla letteratura [13] la strategia di formazione di un film di citocromo c (cit c), preformando uno strato di lipidi il cui gruppo di testa abbia una carica opposta a quella presentata superficialmente dalla proteina. Il lipide usato è la fosfatidilserina, poichè al pH usato per la deposizione (pH = 7.4) il citocromo presenta un eccesso di 8 cariche positive superficiali e l'introduzione della proteina viene effettuata dopo la formazione preliminare dello strato lipidico. L'adesione del citocromo è stata controllata mediante spettroscopia di polarizzazione che ha indicato inoltre l'orientamento del citocromo nel film: il piano dell'eme è parallelo alla superficie acquosa.

Un legame covalente tra lipide e citocromo c è stato realizzato dal gruppo di Pachence [14]: in questo lavoro è stato usato il citocromo c di lievito, che ha una cisteina in posizione 102 in grado di reagire con la fosfatidilserina ed il tioetilsteato. Il film è stato depositato ed analizzato mediante spettrofotometria a radiazione polarizzata. Queste misure hanno indicato che il

citocromo nel film è orientato con il gruppo eme parallelo alla superficie del substrato.

Lo scopo della presente invenzione è di ottenere, mediante le tecniche LB e/o LS, un film proteico stabile ed orientato, grazie alla realizzazione di una interazione specifica tra una molecola lipidica ed una proteina, in particolare una metallo-proteina. Le metallo-proteine preferite comprendono il citocromo c, l'azurina ed il citocromo P450 SCC. La reazione tra il lipide di sintesi e la proteina coinvolge l'arginina che è presente in singola copia nel citocromo c e nell'azurina. Nel citocromo P450 SCC, a causa della presenza di numerosi residui di arginina, è necessaria la modifica di tali amminoacidi, in modo da lasciarne uno solo nella posizione desiderata, per garantire l'univocità della funzionalizzazione. Il lipide di ancoraggio previsto, deve possedere una catena alifatica di almeno 18 atomi di carbonio, per garantire stabilità del film LB, e deve avere la testa modificata con il gruppo dichetonico per legarsi in maniera specifica all'arginina. Le migliori condizioni di deposizione del lipide sono trovate mediante diffrattometria a raggi X e la formazione del complesso lipide-citocromo può essere realizzata all'interfaccia aria-acqua. Il complesso, una volta depositato, può essere preliminarmente caratterizzato mediante spettroscopia di assorbimento spettropolarimetria e diffrattometria a raggi X.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un film lipide-proteina orientato comprendente un lipide con una catena

alifatica di almeno diciotto atomi di carbonio ed una testa polare ed una proteina comprendente un solo residuo amminoacidico sulla sua superficie esterna in grado di reagire con la testa polare del lipide.

Preferibilmente il lipide ha una catena alifatica di venti atomo di carbonio.

Secondo una forma preferita di attuazione la testa polare del lipide comprende un gruppo dichetonico e il residuo amminoacidico della proteina è arginina.

Secondo una forma preferita di attuazione la proteina è una metallo-proteina, più preferibilmente compresa nel gruppo di: citocromo c, azurina e citocromo P450 scc modificato per mutagenesi sito specifica in maniera tale da presentare un solo residuo di arginina sulla sua superficie esterna.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione un procedimento per la produzione di un film orientato lipide-proteina comprendente i seguenti passaggi:

- sintesi chimica di un lipide dichetonico con catena alifatica di almeno 18 atomi di carbonio;
- selezione di una proteina avente un unico residuo di arginina sulla sua superficie esterna, o modificazione a mezzo di mutagenesi sito-specifica di una proteina, in maniera tale che presenti un unico residuo di arginina sulla sua superficie esterna;
- filmazione e deposizione di detto lipide dichetonico;
- interazione di detto lipide dichetonico formante un film con detta proteina.

Preferibilmente la proteina è una metallo-proteina, più preferibilmente compresa nel gruppo di: citocromo c, azurina e citocromo P450 scc modificato per mutagenesi sito specifica in maniera tale da presentare un solo residuo di arginina sulla sua superficie esterna.

Preferibilmente la filmazione avviene all'interfaccia aria-acqua, con deposito del film di lipide dichetonico su un substrato di silicio a mezzo di tecnica di Langmuir-Schaefer (LS) o di Langmuir-Blodgett (LB).

Preferibilmente l'interazione del lipide dichetonico formante un film con la proteina avviene con il lipide in fase di liquido condensato o con il lipide in fase di liquido espanso.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo ma non limitativo con riferimento ai disegni allegati in cui:

la figura 1 rappresenta uno schema della reazione chimica tra il gruppo dichetonico del lipide e il residuo di arginina;

la figura 2 rappresenta la struttura bidimensionale del citocromo c, in cui è evidenziata l'arginina in posizione 91;

la figura 3 rappresenta la struttura bidimensionale dell'azurina c, in cui è evidenziata l'arginina in posizione 79;

la figura 4 rappresenta uno schema della reazione tra il citocromo c ed il 2,3 eneicosandione in forma di liquido condensato;

la figura 5 rappresenta uno schema della reazione tra il citocromo c ed il 2,3 eneicosandione in forma di liquido espanso.

a) Selezione della metallo proteina

La scelta di molecole biologiche per la realizzazione di film proteici orientati deve rispondere ai seguenti requisiti: conoscenza della struttura primaria e delle caratteristiche biofisiche e biochimiche della proteina; conoscenza del sistema; possibilità di ottenere in grandi quantità la proteina, per esempio per via ricombinante; possibilità di ingegnerizzare la proteina in modo da poterla adattare meglio all'uso richiesto; esistenza di una asimmetria nella distribuzione di carica che può essere utile per orientare la molecola per mezzo di un campo elettrico esterno.

Il citocromo c possiede, insieme a tutte queste proprietà, due altre caratteristiche rilevanti per la formazione di film proteici orientati: è commercialmente disponibile a basso costo e la sua superficie esterna ha una sola arginina che consente una specifica funzionalizzazione. L'azurina ha caratteristiche analoghe a quelle del citocromo c.

Se la proteina non presenta sulla superficie siti di ancoraggio unici o nella posizione desiderata, mediante l'uso di mutagenesi sito-specifica è possibile modificarne la struttura primaria, o inserendo l'amminoacido voluto nella posizione richiesta, o sostituendo gli amminoacidi che non si desidera far reagire. La scelta della posizione efficace dell'amminoacido da funzionalizzare e gli effetti provocati dalla mutagenesi possono essere previsti mediante programmi di visualizzazione delle proteine mutate e minimizzazione dell'energia. Per esempio, la metallo-proteina citocromo P450 SCC, non avendo residui amminoacidici unici sulla

superficie esterna, non può essere ordinata nello spazio bidimensionale in modo univoco, se non dopo una valutazione attenta degli amminoacidi da mutare.

Citocromo c

La determinazione della composizione amminoacidica della superficie esterna del citocromo c è stata eseguita mediante la visualizzazione sulla base delle coordinate della proteina depositate presso la Protein data bank di Brookhaven con la Silicon Graphics Iris Crimson (nome file pdbcyc.ent). La composizione amminoacidica complessiva del citocromo c estratto da cuore di cavallo è riportata nella Tabella I [15].

Tabella I

Composizione amminoacidica del Citocromo C

Amminoacidi	N° residui	Amminoacidi	N° residui
Gly	12	Ala	6
Asp	8	His	3
Val	3	Thr	10
Glu	12	Pro	4
Lys	19	Leu	6
Ile	6	Arg	2
Phe	4	Tyr	2
Cys	2	Met	5

Il citocromo c è presente in tutti gli organismi aerobici, e nei mitocondri delle cellule animali. Il citocromo c fa parte della catena di trasporto elettronico per i processi ossidativi necessari per la

respirazione, ed è una proteina molto conservata durante il processo evolutivo. Il citocromo possiede il gruppo prostetico eme, contenente un atomo di ferro, che è il sito che si ossida e si riduce nel processo di trasporto elettronico. La proteina consiste di 104 amminoacidi, più il gruppo eme, i cui gruppi vinilici sono attaccati covalentemente attraverso i residui di cisteina 14 e 17. Il ferro al centro dell'eme ha due legami assiali con la metionina 80 e l'istidina 18 [16]. Il suo peso molecolare è di 13 KDa ed il suo diametro approssimativamente è di 34 Å. Gli amminoacidi presenti in minor numero sono la cisteina e l'arginina. Le cisteine, essendo impegnate nel legame con l'eme, non possono essere funzionalizzate. Una delle due arginine è interna e non può essere modificata perché inaccessibile. L'altra, in posizione 91, è sulla superficie esterna del citocromo c e può essere funzionalizzata in modo univoco (figura 2). Le stesse procedure illustrate per il citocromo c sono applicabili a qualsiasi altro tipo di proteina.

Azurina

L'azurina è una proteina di 128 amminoacidi di peso molecolare 14 KDa, contenente un atomo di rame che le conferisce un alto potenziale redox. Infatti l'azurina è presente nel batterio Pseudomonas aeruginosa agendo come vettore di elettroni quando il batterio è cresciuto in condizioni denitrificanti [17, 18]. L'atomo di rame è coordinato a due residui di istidina in posizione 46 e 117. La proteina ha una forma che può essere paragonata ad un parallelepipedo di dimensioni approssimativamente di 25 x 30 x 40

Å. La struttura è visualizzabile tramite le coordinate della proteina depositate presso la Protein data bank di Brookhaven con la Silicon Graphics Iris Crimson (nome file pdblazu.ent). La composizione amminoacidica complessiva dell'azurina è riportata nella Tabella II.

Tabella II

Composizione amminoacidica dell'azurina

Amminoacidi	N° residui	Amminoacidi	N° residui
Gly	11	Ala	7
Asp	11	His	4
Val	10	Thr	9
Glu	4	Pro	4
Lys	11	Leu	10
Ile	4	Arg	1
Phe	6	Tyr	2
Asn	7	Trp	1
Ser	10	Gln	6
Cys	3	Met	6

Esiste una sola arginina (Arg 79) che si trova nella parte esterna della proteina ed è quindi funzionalizzabile (figura 3).

Citocromo P450 scc

Il citocromo P450 scc estratto da ghiandola surrenale bovina è una proteina che si trova sulla membrana mitocondriale e consta di 520 amminoacidi con un peso molecolare 56 KDa. Il P450 scc è una metallo-proteina contenente un atomo di ferro come centro redox [19]. La sua forma può essere approssimata a

quella di una piramide a base triangolare, il cui lato è approssimativamente di 70 Å. La struttura è visualizzabile tramite le coordinate della proteina depositate presso la Protein data bank di Brookhaven con la Silicon Graphics Iris Crimson (nome file pdblscs.ent). Dall'analisi emerge che le arginine in totale sono 29, di cui solo 6 (tabella III) sono accessibili. Su queste sei vanno indirizzati gli sforzi di mutazioni sito specifiche per avere un singolo residuo reattivo.

Tabella III

Posizione Arg	Esterne	Parzialmente coperte	Interne
Residui ¹	29, 82, 252, 321, 322, 473	35, 39, 52, 93, 147, 251, 305, 314	8, 113, 180, 218, 221, 226, 257, 347, 357, 385, 400, 412, 421, 426, 427
Totale	6	8	16

¹ Il numero indica la posizione nella sequenza primaria del citocromo.

Le mutazioni vanno prima verificate con programmi di grafica molecolare per determinare se le modificazioni effettuate inducano cambi conformazionali e/o funzionali rilevanti. Successivamente occorre scegliere quale dei sei amminoacidi mantenere in base all'orientazione desiderata per la proteina.

La procedura indicata per il citocromo P450 scc è valida per qualsiasi proteina si desideri ancorare; infatti, previo controllo

degli amminoacidi di superficie ed eventuali mutazioni da effettuare, la strategia proposta è la medesima.

b) Sintesi chimica del lipide -dichetonico

Il lipide proposto per la sintesi deve avere una catena alchilica di almeno 18 atomi di carbonio e la testa polare deve contenere il gruppo dichetonico. In questo modo tale molecola può essere correttamente posta in film mediante la tecnica LB e può anche reagire con l'arginina del citocromo come riportato in figura 1 [10]. Un dichetone utilizzato è il 2,3-butandione.

c) Filmazione, deposizione e caratterizzazione R-X del lipide dichetonico

Materiali: tampone borato 50 mM pH 8.6, -dichetone 0.5 mg/ml in CH_2Cl_2 , silicio.

Filmazione all'interfaccia aria/acqua e registrazione isoterma

La subfase utilizzata per la filmazione è il tampone borato ed è quella in cui poi verrà eseguita la reazione di legame con il citocromo c. Lo spargimento del lipide è stato eseguito nel modo seguente: 40 l della soluzione lipidica sono dispersi sulla superficie della subfase e, dopo una attesa di 5 minuti, si procede alla registrazione dell'isoterma. La velocità di compressione delle barriere da impostare è pari a 0,2 mm/sec.

Preparazione del substrato

Il substrato per le deposizioni è silicio non drogato. Il lavaggio viene effettuato lavando il campione con detergente e quindi risciacquando in acqua corrente e bidistillata. Il film viene

asciugato sotto un flusso di azoto. Il substrato viene poi immerso per 30 minuti in miscela solfocromica, quindi sciacquato accuratamente in acqua bidistillata ed asciugato con flusso di azoto. L'idrofobizzazione del silicio viene effettuata immergendo il substrato per 3 volte in una soluzione di acido fluoridrico (HF) al 48% e risciacquando con acqua bidistillata ed asciugando sotto flusso di azoto. Per la caratterizzazione spettrofotometrica e spettropolarimetrica il substrato di deposizione è una cuvetta di quarzo pulita come già indicato per il silicio.

Deposizione del film di lipide dichetonico

Dall'esame della curva isoterma è possibile scegliere la migliore pressione di deposizione. Si possono effettuare due differenti tipi di deposizione: Langmuir-Schaefer (LS) e Langmuir-Blodgett (LB).

1) Deposizione LS

Il film del dichetone all'interfaccia aria/acqua viene compresso fino alla pressione di deposizione con un feedback di 10, quindi si depositano 20 strati del film per l'esame ai raggi X. Il substrato di deposizione è costituito da silicio che è stato opportunamente lavato ed idrofobizzato.

2) Deposizione LB

Anche in questo caso il film all'interfaccia aria/acqua viene realizzato con le modalità precedentemente descritte. Per la deposizione LB è necessario impostare la velocità di immersione ed emersione del substrato. Per la deposizione dei primi due strati la

velocità deve essere 0,1 mm/sec per garantire una buona deposizione. Per gli strati successivi la velocità viene incrementata a 0,35 mm/sec. Con questa procedura sono depositati ed esaminati ai raggi X campioni costituiti da 20 strati.

Caratterizzazione R-X del film del lipide dichetonico

I film depositati si analizzano con un diffrattometro R-X con una sorgente la cui lunghezza d'onda di emissione è di 1,54 Å ed una incertezza nella determinazione di 0,01°.

d) Interazione dichetone citocromo c: analisi spettrofotometrica e a raggi X.

Materiali: tampone borato 50 mM pH 8.6, -dichetone 0.5 mg/ml in CH₂Cl₂, silicio non drogato, citocromo c (cuore di cavallo) acquistato da Sigma.

Preparazione della soluzione di citocromo c

Il citocromo è sciolto in una soluzione di tampone borato 50 mM pH 8,6 ad una concentrazione finale di 0.5 mg/ml. Lo spettro va registrato nella regione compresa tra 240 nm a 600 nm, con uno spettrofotometro UV/VIS Jasco 7800. È ben visibile il picco di assorbimento dell'eme intorno a 410 nm.

La stessa soluzione può essere utilizzata per l'analisi spettropolarimetrica. L'analisi viene compiuta con uno spettropolarimetro Jasco 710 nella regione di assorbimento del legame peptidico nella regione che va da 180 nm a 260 nm.

Filmazione deposizione e caratterizzazione ai raggi X spettrofotometrica e spettropolarimetrica del complesso lipide-citocromo c

La reazione di legame del dichetone e del citocromo c viene eseguita effettuando la reazione di legame con il lipide in fase di liquido condensato, che consiste nella compressione del lipide fino alla pressione di deposizione, quindi nell'aggiunta del citocromo c, nella reazione di legame, e nella deposizione; o in fase di liquido espanso, che consiste nella compressione del lipide fino a 6 mN/m nell'aggiunta del citocromo c, nella reazione di legame e nella deposizione.

Reazione lipide-citocromo c in fase liquido-condensato

Lo schema di reazione è riportato nella figura 4. La subfase utilizzata è tampone borato utilizzato in precedenza su cui vengono dispersi 40 l di soluzione di dichetone. Il lipide così disperso viene compresso fino ad una pressione superficiale di deposizione con una velocità delle barriere di 0,2 mm/sec. Appena raggiunta tale pressione viene aggiunto il citocromo c ad una concentrazione finale di 50 g/ml. Si attendono circa due ore prima della deposizione del complesso lipide-citocromo c per garantire il verificarsi della reazione di legame. Dopo tale attesa si può procedere sia alla deposizione verticale che orizzontale del film. Il substrato di deposizione è il silicio precedentemente lavato ed idrofobizzato come descritto nel paragrafo precedente. I campioni sono analizzati ai raggi X.

È possibile effettuare una deposizione del complesso lipide dichetone anche su quarzo per consentire l'esame spettrofotometrico e spettropolarimetrico del film. Il quarzo viene idrofobizzato previa deposizione con acido arachidico (deposizione verticale) alla pressione di 30 mN/m.

Reazione lipide-citocromo c in fase liquido-espanso

Lo schema della procedura è illustrato nella figura 5. In questo caso l'unica differenza rispetto alla procedura appena descritta è che l'interazione lipide citocromo c viene effettuata quando il lipide si trova nella fase di liquido espanso e questo si ottiene comprimendo il lipide fino a 6 mN/m con una velocità delle barriere di 0,2 mm/sec. Il tempo per l'interazione tra il lipide ed il citocromo è di due ore. Dopo tale attesa il film può essere compresso alla pressione di deposizione e quindi trasferito su supporto di silicio e su quarzo (20 strati) per l'esame diffrattometrico, spettrofotometrico e spettropolarimetrico.

Formazione del film e sua caratterizzazione

L'isoterma del film di dichetone è necessaria per la determinazione della pressione di deposizione poichè questa si effettua quando il film è in fase condensata. La regione lineare della curva isoterma rappresenta il film nella fase di liquido-condensato e in questa zona è calcolata anche l'area per molecola con il metodo della tangente [9]. Tutte le fasi di formazione del film, la sua deposizione ed interazione con il citocromo c sono eseguite in

tampone borato poichè sono le migliori condizioni di legame come indicato in [20].

La deposizione del film è eseguita sia con modalità LB che LS per verificare le migliori condizioni di deposizione. Gli spettri di diffrazione a raggi X indicano se si ha la formazione di un film ordinato e lo spessore dell'unità ripetitiva per entrambi i tipi di deposizione.

La fase successiva del lavoro prevede l'interazione all'interfaccia aria/acqua tra il lipide ed il citocromo c che si fa avvenire sia quando il lipide si trova in fase condensata, sia quando il lipide si trova in fase espansa. Nel primo caso il lipide, occupando tutta la superficie, impedisce al citocromo di raggiungere l'interfaccia aria/acqua e denaturarsi (fig. 4), ma ha una minore capacità di riorientarsi per ottimizzare la reazione di legame con l'arginina. Nel secondo caso (fig. 5), il lipide trovandosi nella fase di liquido espanso ha più possibilità di movimento e quindi di adattarsi nel modo migliore all'arginina della metallo proteina. In questa situazione è possibile riscontrare una più bassa pressione di collasso del film all'interfaccia aria/acqua. Ciò può suggerire sia che parte della proteina si sia portata all'interfaccia aria/acqua denaturandosi e rendendo il film più flessibile, sia che abbia avuto luogo la reazione di legame lipide-proteina. La proteina si denatura poichè i lipidi, trovandosi nella fase espansa, non coprono tutta la superficie acquosa che viene, quindi, lasciata libera alla proteina. In entrambi i casi si effettua la deposizione per rendere possibile le misure

spettrofotometriche, di dicroismo circolare e di diffrazione ai raggi X. Le misure spettrofotometriche, indicando la presenza delle bande di assorbimento dei gruppi prostetici delle metallo proteine (gruppo eme per i citocromi), confermano la presenza della metallo proteina ed il suo grado di ossidazione, mentre le misure diffrattometriche danno indicazione sulla presenza di un film ordinato del complesso lipide proteina. Le misure di dicroismo circolare danno informazioni circa il grado di denaturazione della metallo proteina nel film e quindi sulla presenza della stessa per quelle proteine che non presentano particolari assorbimenti.

Con tale metodologia si è in grado di funzionalizzare l'arginina di qualsiasi proteina, dopo un ciclo di mutazioni sito specifiche e di produrre con la tecnica LB film ordinati ed orientati di complessi lipide-proteina nello spazio bidimensionale. L'uso dei lipidi è estremamente importante poichè impedisce la denaturazione della proteine stesse all'interfaccia aria/acqua.

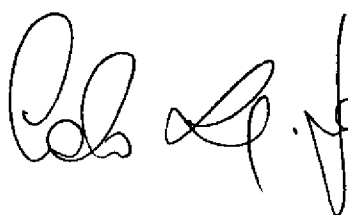
La presente invenzione è stata descritta, a titolo illustrativo ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, ma è da intendersi che variazioni e/o modifiche potranno essere apportate dagli esperti nel ramo senza per questo uscire dal relativo ambito di protezione.

Bibliografia

1. J.M. Pachence, P.L. Dutton, J.K. Blasie, Biochim. Biophys. Acta, 548, pp 348-373, 1979

2. J.M. Pachence, P.L. Dutton, J.K. Blasie, *Biochim. Biophys. Acta*, 724, pp 6-19, 1983
3. J.M. Pachence, P.L. Dutton, J.K. Blasie, *Biochim. Biophys. Acta*, 635, pp 267-283, 1981
4. J.K. Blasie, M. Erecinska, S. Samuels, J.S. Leigh, *Biochim. Biophys. Acta*, 501, pp 33-53, 1978
5. R. Henderson, P.N.T. Unwin, *Nature (Lond.)*, 257, pp 28-32, 1975
6. L.B. Wingard Jr., E. Katchalski-Katzir, L. Goldstein, *Immobilized Enzyme Principles*, Academic Press N.Y., 1976
7. (a) J. Porath, *J. Biotechnol. Prog.*, 3, 14, 1987.
 (b) T.J. Mizutani, *J.Liq.Chromatogr.*, 9, 69, 1985
8. V.I. Sevastianov, *Crit. Rev. Biocompat.*, 4, 109, 1988
9. G. Roberts, *Langmuir-Blodgett Films*, Plenum Press N.Y. 1990 p. 21
10. I. Langmuir, *Schaefer, J.A.C.S.*, 60, 1351 -1360, 1938
11. Y.M. Lvov, V.V. Erokhin, S.Y. Zaitsev, *Biol. Membr.*, vol 4(9), 1991, pp 1477-1513
12. Z. Kozarac, A. Dhathathereyan, D. Mobius, *FEBS lett.*, 229, pp 372-376, 1988
13. D.G. Zhu, M.C. Petty, *Thin Solid Films*, 176, pp151-156, 1989
14. J.M. Pachence, S. Amador, G. Maniara, J. Vanderkooi, P.L. Dutton, J.K. Blasie, *Biophysical J.*, 58, pp 379-38, 1990
15. E. Margoliash, E.L. Smith, *Nature*, 192, 1125-1127, 1961
16. L.Stryer *Biochimica*, Ed Zanichelli 1989 Bologna

17. H. Nar, A. Messerschmidt, R. Huber, M. van de Kamp,
G.W. Canters FEBS, vol 306(2-3), 119-124, 1992.
18. M. van de Kamp, G.W. Canters, S.S. Wijmenga, A. Lommen,
C.W. Hilbers, H. Nar, A. Messerschmidt, R. Huber, Biochemistry, vol
31, 10194-10207, 1992
19. T.D. Porter, M.J. Coon, J. Biol. Chem, vol 25, 13469-13472,
1991
20. Riordan, Biochemistry, vol 12, n 20, pp3915-3923, 1973



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Carlo Luigi Iannone
(R. d. loc. 456)

ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



RIVENDICAZIONI

1. Film lipide-proteina orientato caratterizzato dal fatto di comprendere un lipide con una catena alifatica di almeno diciotto atomi di carbonio ed una testa polare, ed una proteina comprendente un solo residuo amminoacidico sulla sua superficie esterna in grado di reagire con la testa polare di detto lipide.
2. Film lipide-proteina orientato secondo la rivendicazione 1 in cui detto lipide ha una catena alifatica di venti atomi di carbonio.
3. Film lipide-proteina orientato secondo la rivendicazione 1 in cui la testa polare del lipide comprende un gruppo dichetonico e il residuo amminoacidico della proteina è arginina.
4. Film lipide-proteina orientato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui detta proteina è una metallo-proteina.
5. Film lipide-proteina orientato secondo la rivendicazione 4 in cui detta metallo-proteina è compresa nel gruppo di: citocromo c, azurina e citocromo P450 scc modificato per mutagenesi sito specifica in maniera tale da presentare un solo residuo di arginina sulla sua superficie esterna.
6. Procedimento per la produzione di un film orientato lipide-proteina comprendente i seguenti passaggi:
 - sintesi chimica di un lipide dichetonico con catena alifatica di almeno 18 atomi di carbonio;
 - selezione di una proteina avente un unico residuo di arginina sulla sua superficie esterna, o modificazione a mezzo di

ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

mutagenesi sito-specifica di una proteina, in maniera tale che presenti un unico residuo di arginina sulla sua superficie esterna;

- filmazione e deposizione di detto lipide dichetonico;
- interazione di detto lipide dichetonico formante un film con detta proteina.

7. Procedimento per la produzione di un film orientato lipide-proteina secondo la rivendicazione 6 in cui detta proteina è una metallo-proteina.

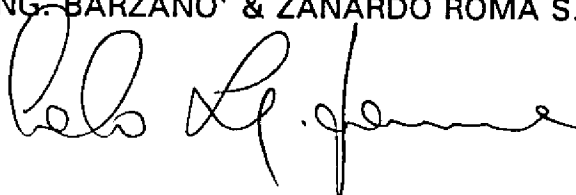
8. Procedimento per la produzione di un film orientato lipide-proteina secondo la rivendicazione 7 in cui detta metallo-proteina è compresa nel gruppo di: citocromo c, azurina e citocromo P450 scc modificato per mutagenesi sito specifica in maniera tale da presentare un solo residuo di arginina sulla sua superficie esterna.

9. Procedimento per la produzione di un film orientato lipide-proteina secondo la rivendicazione 6 in cui detta filmazione avviene all'interfaccia aria-acqua, con deposito del film di lipide dichetonico su un substrato di silicio a mezzo di tecnica di Langmuir-Schaefer (LS) o di Langmuir-Blodgett (LB).

10. Procedimento per la produzione di un film orientato lipide-proteina secondo la rivendicazione 6 in cui detta interazione del lipide dichetonico formante un film con la proteina avviene con il lipide in fase di liquido condensato o con il lipide in fase di liquido espanso.

Roma, 25 LUG. 1994

p.p.: Technobiochip, Consorzio di Ricerca Industriale Avanzata
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

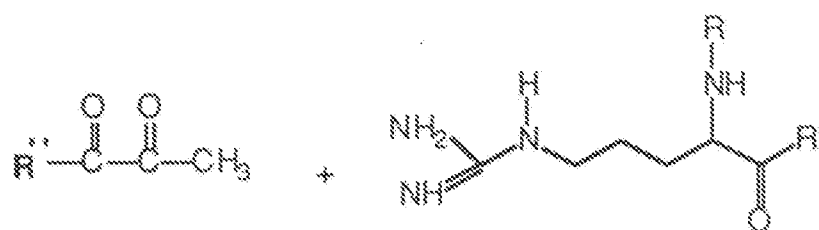


UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Carlo Luigi Iannone
(N° d'iscr. 456)



ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

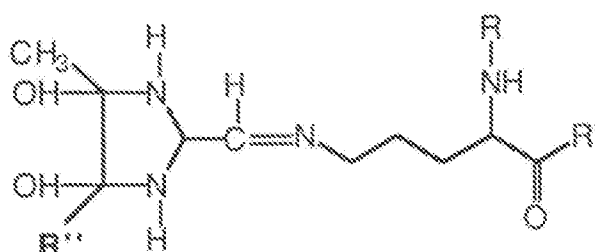
1/5



lipide con gruppo di testa -dichetonico

Arginina

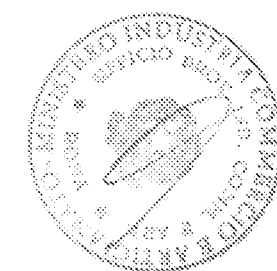
R'' rappresenta la catena alchilica



Arginina modificata

Figura 1

p.p.: TECHNOBIOCHIP-CONSORZIO DI RICERCA INDUSTRIALE AVANZATA
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



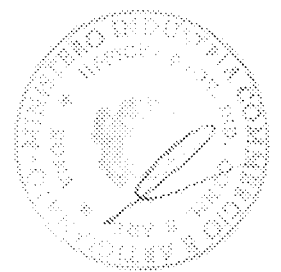
UN MANDATO...
per se e per gli altri
Antonio Tallero
(N° d'iscr. 171)

Italiano



ARG 91

Figura 2



RPC 79

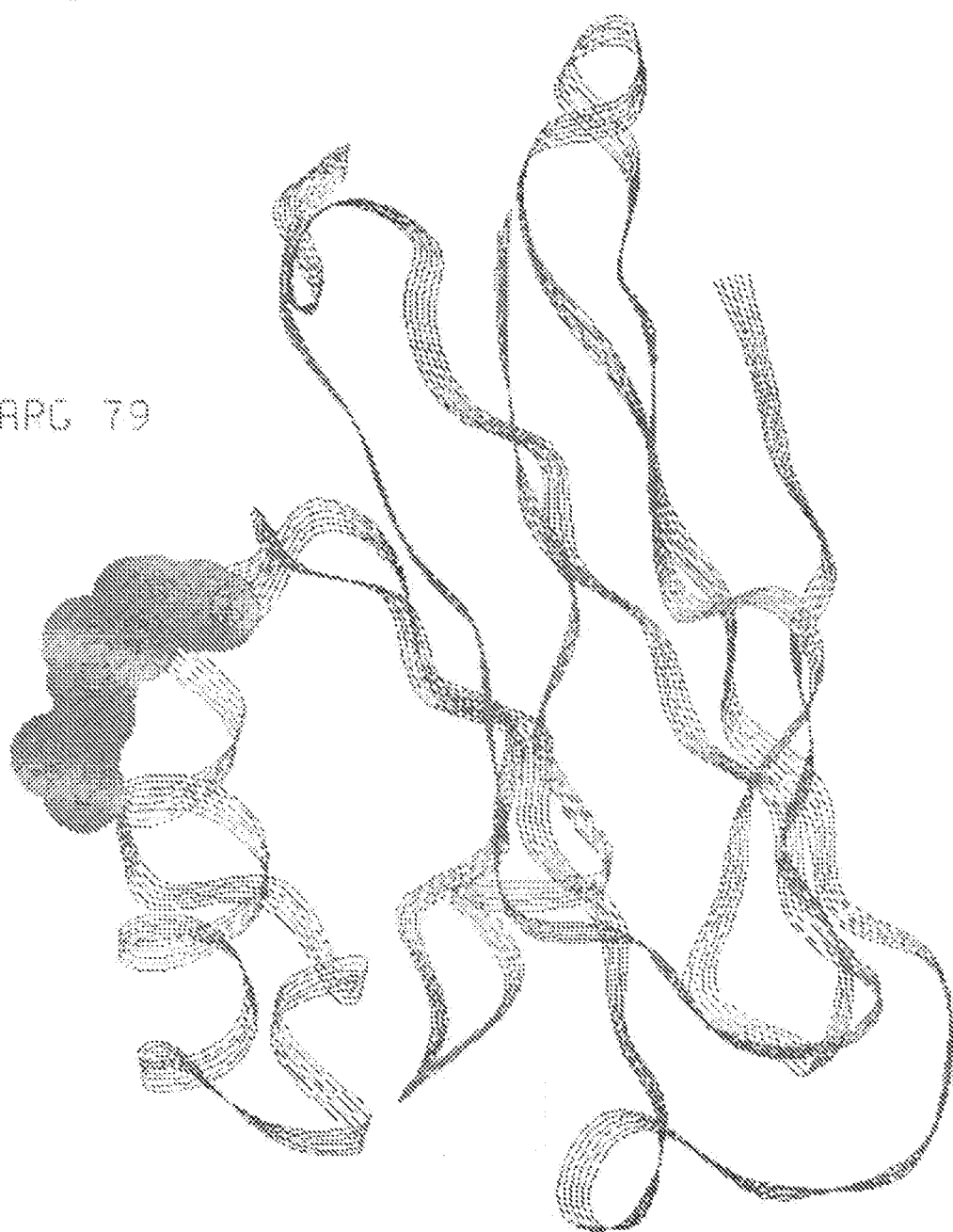
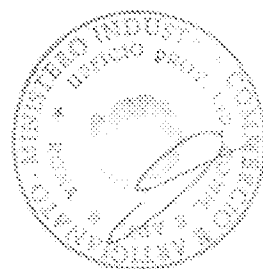


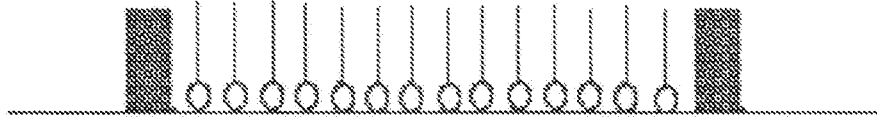
Figura 3



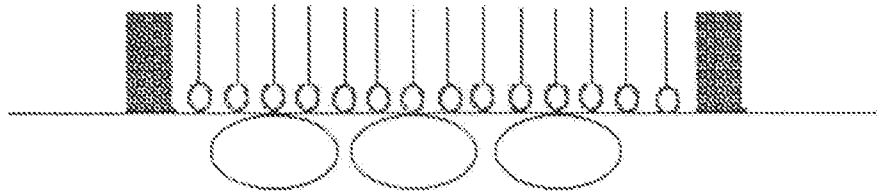
p.p.: TECHNOBIOCHIP-CONSORZIO DI RICERCA INDUSTRIALE AVANZATA
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATO...
per te e per gli altri
Antonio Toliercio
(N° d'iscri. 171)

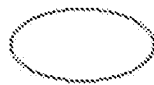
italiano



1) compressione del film lipidico fino alla pressione di deposizione



2) immissione del citocromo c nella subfase e sua interazione con il lipide

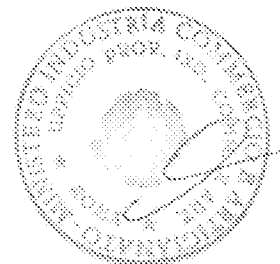


Citocromo c

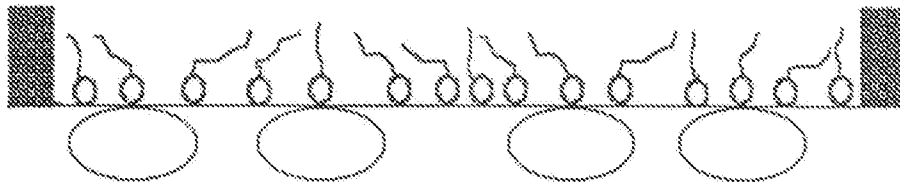


Dichetone

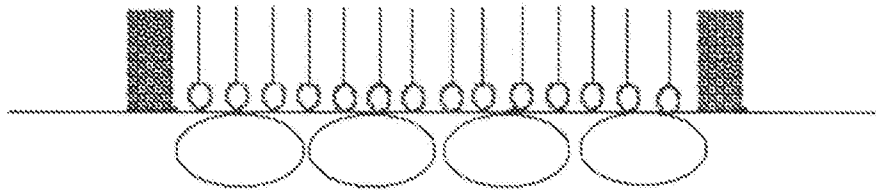
Figura 4



5/5



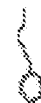
1) compressione del lipide fino a 6 mN/m, immissione del citocromo c nella subfase e sua interazione con il lipide



2) ulteriore compressione fino alla pressione di deposizione

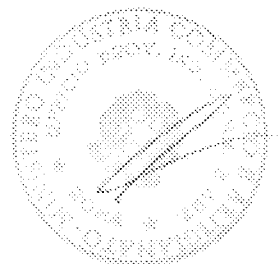


Citocromo c



Dichetone

Figura 5



p.p.: TECHNOBIOCHIP-CONSORZIO DI RICERCA INDUSTRIALE AVANZATA
ING. BARZANO¹ & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Tallero
(N° d'iscr. 171)

Tallero