

(11) Número de Publicação: **PT 1904854 E**

(51) Classificação Internacional:
G01N 33/68 (2007.10) **G01N 33/53** (2007.10)
G01N 33/566 (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2006.07.17**

(30) Prioridade(s): **2005.07.19 EP 05015597**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.04.02**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.03.31**
125/2009

(73) Titular(es):
UNIVERSITA` DEGLI STUDI DI MILANO
VIA FESTA DEL PERDONO, 7 20122 MILANONIT

(72) Inventor(es):
RICARDO BROGLIA IT
GUIDO TIANA IT

(74) Mandatário:
ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO
RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DA DOBRAGEM DE PROTEÍNAS**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"PROCESSO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DA DOBRAGEM DE PROTEÍNAS"

A presente invenção refere-se a um processo para a identificação de inibidores da dobragem e, portanto, da(s) função(ões) biológica(s) de proteínas e, mais particularmente, de inibidores peptídicos da dobragem de proteínas que são altamente selectivas e que não criam resistência.

Antecedentes

O facto das proteínas terem uma função fisiológica principal é bem conhecido na técnica. Têm sido feitos muitos esforços para utilizar proteínas como agentes terapêuticos, como catalisadores e também como materiais adequados que têm propriedades específicas.

Muitas doenças surgem de mutações em proteínas que fazem com que percam funcionalidade. Nalguns casos, por exemplo, a actividade catalítica exercida por proteínas pode ser dificultada, resultando num percurso metabólico alterado (e.g., fenilcetonúria). Noutros casos, podem ser afectadas as propriedades estruturais das próprias proteínas de modo que levam a uma perda de funcionalidade física (e.g., distrofia muscular). A doença de Creutzfeld-Jakob e outras encefalopatias transmissíveis podem ser resultado de modificações estruturais das proteínas que mudam a sua forma e formam polímeros [1].

Igualmente, as doenças também podem ser o resultado de amiloidose na qual as proteínas se convertem gradualmente em cadeias longas de folhas beta polimerizadas e precipitam para formar fibrilas [2].

É sabido que muitos cancros ocorrem devido a mutações de proteínas. Nesta medida, sabe-se que cerca de 50% dos cancros humanos são provocados por mutações no factor P53 supressor de tumor que, principalmente, diminui a sua estabilidade [3].

As enzimas e receptores são os alvos habituais dos fármacos, para restabelecer a sua função ou para destruir agentes infecciosos ou cancros. O objectivo final na ciência das proteínas é ser capaz de prever, tanto a estrutura como a actividade de proteínas pelas suas sequências de aminoácidos (o chamado "problema de dobragem"), assim como inibir a sua actividade [4,5].

Com esta conquista poderiam conceber-se e sintetizar-se novos catalisadores, materiais e agentes farmacologicamente activos, em particular, fármacos adequados para inibir a actividade enzimática.

As propriedades principais que podem apresentar estes fármacos são especificidades (*i.e.*, não serem tóxicos) e eficácia. Convencionalmente isto pode ser conseguido, por selagem do sítio activo da enzima (inibição competitiva) ou através da ligação nalgumas outras regiões/partes da proteína, provocando assim modificações estruturais que fazem com que a enzima não seja adequada para a ligação ao substrato (inibição alostérea).

Para alcançar qualquer destes objectivos, deve otimizar-se a ligação entre o ligando e a proteína. Isto é um problema bastante grande que requer tempo, devido ao facto de ser necessário calcular, não só as energias entre enzimas e substrato ou outros ligandos, mas também as suas energias de interacção com a água e a mudança de entropia durante a reacção. As energias de ligação líquidas são as pequenas diferenças entre dois números maiores.

Surge ainda outra complicação no caso do alvo ser uma proteína viral que apresenta uma taxa de mutação alta, muitas vezes associada ao bem conhecido desenvolvimento de resistência. Portanto, é de importância crucial idealizar novas estratégias que permitam uma concepção mais eficaz e económico de inibidores de proteínas relativamente a concepções conhecidas centradas no sítio activo, assim como para gerar estratégias dirigidas a bloquear a interacção entre enzimas e o seu substrato que não gerem resistência.

Uma série de estudos teóricos [9,10] e experimentais [6-8,38,41] sugerem que as proteínas globulares de domínio único (*i.e.*, proteínas de comprimento N compreendidas entre 60 e 150 aminoácidos [28]) se dobram através de um mecanismo hierárquico, em que pequenas unidades compostas de poucos aminoácidos consecutivos constroem unidades maiores que, por sua vez, constroem unidades ainda maiores que, finalmente, envolvem toda a proteína.

Os estudos experimentais da dobragem e associação de segmentos de cadeias de aminoácidos, antes da formação do estado nativo, identificaram estruturas de tipo parcialmente nativas entre os eventos de dobragem iniciais [39]. Estes elementos

estruturais denominam-se, normalmente, domínios de dobragem ou dobrados [9]. A definição operacional destas unidades é: “a estrutura tridimensional das primeiras estruturas nativas observáveis, em que a proteína se dobra, começando a partir de um estado desnaturado”. As mutações no interior destes domínios estruturais podem limitar gravemente a formação de uma proteína adequadamente dobrada [10].

Os cálculos de modelos [11,12] mostraram que a dobragem de proteínas de domínio único, monoméricas e pequenas, prossegue, partindo de uma conformação não dobrada, seguindo uma sucessão hierárquica de eventos: 1) formação de poucas (2-4) estruturas elementares locais (habitualmente denominadas como LES) contendo no total de cerca de 20% a cerca de 30% dos aminoácidos da proteína (e, portanto, entre 5% e 15% de cada um dos aminoácidos da proteína), estabilizadas por poucos aminoácidos hidrófobos que interagem fortemente (“quentes”), altamente conservados (<10% dos aminoácidos da proteína) que se situam perto ao longo da cadeia de polipéptido; 2) conexão das LES no núcleo de dobragem (pós-crítica) [13], isto é, formação do conjunto mínimo de contactos nativos que levam o sistema até à barreira de energia livre principal de todo o processo de dobragem; 3) relaxação do resto dos aminoácidos na estrutura nativa pouco depois da formação do núcleo de dobragem. Verificou-se que os sítios “quentes” que estabilizam as LES são muito sensíveis a mutações pontuais (não conservativas). Dado que a maior parte da energia de estabilização da proteína se concentra nestes sítios, a possibilidade de mutação de uma ou duas delas tem uma alta probabilidade de desestabilizar a conformação dobrada. É natural identificar os domínios de dobragem do parágrafo anterior com as LES dos cálculos de modelos.

O mesmo modelo indica que se pode desestabilizar a conformação nativa de uma proteína utilizando péptidos (que se chamarão p-LES) cuja sequência é idêntica à das LES das proteínas [14].

Há duas vantagens importantes destes inibidores de dobragem relativamente aos convencionais. Em primeiro lugar, a sua estrutura molecular é sugerida directamente pela proteína alvo. Não há nada a conceber ou a otimizar, mas apenas encontrar a LES da proteína alvo. Devido ao facto de a concepção das LES ter sido realizado por evolução através de uma miríade de gerações do vírus (ou do organismo que expressa a proteína), para reconhecer e interagir fortemente entre si, de modo a fazer a dobra da proteína rápida, assim como para evitar a agregação de outras proteínas, espera-se que os inibidores resultantes apresentem pouca toxicidade. Em segundo lugar, não é provável que se possam converter em não operativos por mutantes de libertação. De facto, os p-LES ligam-se às LES complementares da proteína alvo, seguindo o mesmo paradigma que estabiliza o núcleo de dobragem, estabilização que é controlada pelos aminoácidos “quentes” da proteína [15,16].

Por conseguinte, os mutantes de libertação podem conter mutações nesses aminoácidos “quentes” que são essenciais para a estabilização e conexão das LES. As referidas mutações conduzem, por norma, à desnaturação da proteína. Por outras palavras, as mutações estruturais que não evitam que a proteína se dobre no seu estado biologicamente activo nativo, nem evitam a conexão das estruturas elementares locais no núcleo de dobragem, nem a acção inibidora dos p-LES. As mutações que evitam a formação do núcleo de dobragem, tanto desestabilizando as LES ou a sua conexão, em princípio, podem evitar a acção dos p-LES, mas não serão

expressas devido à incapacidade de a proteína mutada se dobrar.

Sumário da invenção

Em resumo, a invenção refere-se a um processo simples, económico e (essencialmente) isento de erros para individualizar as LES de proteínas globulares de domínio único (sendo o comprimento típico destas proteínas de 60 a 150). Por conseguinte, refere-se à individualização de inibidores muito eficazes e altamente específicos da dobragem destas proteínas (péptidos p-LES) que não é provável criarem resistência.

Devido ao facto das proteínas globulares de domínio único, como norma, serem construídas como uma combinação de unidades de sequências (domínios, blocos [17-24] ou módulos [25,26] de comprimento característico de cerca de 125 aminoácidos para eucariotas e de cerca 150 aminoácidos para procariotas [27,28]), unidades de sequência que se dobrassem como proteínas de domínio único, a invenção refere-se também ao processo de identificação de inibidores peptídicos da dobragem de proteínas independentemente do seu tamanho ou modularidade, assim como a cada um dos monómeros dos multímeros de três estados [29,30].

No que se segue, a requerente explica a invenção dentro do quadro de unidades de sequência de uma proteína globular ou de um monómero que pertence a um multímero de três estados.

Objectivo da invenção

A presente invenção refere-se a um processo para a identificação de inibidores peptídicos da dobragem e, portanto, da actividade biológica específica [4] de proteínas sem induzir mutantes de libertação.

Portanto, um primeiro objecto da presente invenção é um processo para a identificação de inibidores peptídicos da dobragem de uma proteína contendo N aminoácidos, cujo processo compreende:

a) conceber péptidos M de comprimento L, apresentando, cada, uma sequência idêntica a um segmento da proteína alvo, de modo a que cubram toda a proteína, permitindo uma determinada quantidade de sobreposição entre os diferentes péptidos. Normalmente, L contém cerca de 10 aminoácidos e, de um modo preferido, varia de cerca de 4 a cerca de 20. Por conseguinte, M varia de cerca de 5 a cerca de 50 sendo, normalmente, de cerca de 20.

b) preparar os péptidos M concebidos, individualmente ou em grupos;

c) preparar soluções M contendo cada a proteína em causa e um dos péptidos numa proporção molar adequada e incubar cada das soluções a 37 °C.

d) avaliar a eficácia inibidora do péptido nas soluções anteriores ou o grau de desdobragem ou ambos, mediante técnicas convencionais, de modo a identificar o péptido dotado de actividade inibidora em relação à proteína.

O processo da presente invenção é particularmente vantajoso dado que permite identificar, de uma forma fiável e bastante simples, o péptido, entre os péptidos M concebidos e preparados de propósito que têm uma actividade inibidora, ou mesmo a maior actividade inibidora, face à proteína em causa.

Descrição pormenorizada da invenção

De acordo com a presente invenção, salvo se indicado de outro modo, o termo “péptido(s)” significa cadeia(s) peptídica(s) curta(s) compreendendo, normalmente, na ordem de dez aminoácidos. De um modo preferido, o péptido compreende L aminoácidos em que L varia de cerca de 4 a cerca de 20. A sequência do(s) “péptido(s)”, salvo se definido de outro modo, coincide com um segmento de comprimento igual ao da proteína.

Além disso, por “inibidor peptídico” pretende-se referir um péptido que bloqueia a dobragem da proteína alvo e, por isso, a sua função biológica específica. Ou seja, o inibidor tem uma sequência essencialmente idêntica à de uma LES da proteína e pode também, ser chamado um p-LES [14].

Por “LES” (Estrutura Elementar Local) pretende-se referir às primeiras estruturas nativas formadas muito cedo no processo de dobragem [11,12] (também chamados dobrados ou domínios de dobragem na bibliografia [9,10,38]). Estas estruturas são estabilizadas por aminoácidos que interagem fortemente, em geral hidrófobos, altamente conservados (“quentes”). Pode distinguir-se entre as bem estruturadas, chamadas LES fechadas e menos estruturadas, as chamadas LES abertas [15]. Este último tipo de LES não apresenta, quando se isola no dissolvente, nenhum

contacto nativo (importante). Pelo contrário, as LES fechadas, quando isoladas, apresentam contactos nativos que desempenham um papel importante também no núcleo de dobragem (pós-crítica) [13].

Por núcleo de dobragem "FN" (pós-crítica) referimo-nos ao conjunto mínimo de contactos nativos necessários para superar a barreira de energia livre mais alta encontrada pela proteína em todo o processo de dobragem [13]. Uma grande parte destes contactos surge da conexão das LES. Este evento é essencialmente controlado pelas LES fechadas.

Por aminoácidos "quentes" referimo-nos a aminoácidos que têm um papel central na dobragem de uma proteína. A mutação não conservativa destes aminoácidos conduz, em geral, à desnaturação da proteína [16].

De acordo com a etapa (a) do presente processo, juntamente com qualquer variante da mesma, os péptidos M de comprimento L podem conceber-se para apresentarem uma sequência idêntica a um segmento da proteína em causa. Os valores M e L elegem-se de modo que cubram toda a sequência de aminoácidos da proteína, permitindo também certa quantidade de sobreposição. Tipicamente, L tem 10 aminoácidos (o que corresponde, para as proteínas de domínio único de comprimento N, a cerca de uma décima parte do número total de aminoácidos N, ou seja $L \approx N/10$) e, de um modo preferido, varia de cerca de 4 a cerca de 20. Por conseguinte, M está no intervalo de cerca de 5 a cerca de 50, sendo normalmente de cerca de 20.

Apenas como um exemplo explicativo não limitativo, o presente processo pode proporcionar a identificação de péptidos que têm actividade inibidora face a uma proteína, e.g.,

compreendendo 120 aminoácidos, concebendo 19 péptidos (*i.e.*, M é igual a 19) cada com um comprimento de cadeia de aminoácidos de 12 aminoácidos.

Do que antecede, dado que os 19 péptidos, tendo, cada, um comprimento de 12 aminoácidos, apresentam uma sequência idêntica aos segmentos dados da proteína e que deve cobrir-se toda a sequência da proteína, é claro para os especialistas na técnica que haverá péptidos com segmentos que se sobrepõem (sendo a sobreposição entre cada péptido consecutivo neste exemplo particular de cerca de 50%).

Tipicamente, a etapa (a) do presente processo pode proporcionar a concepção sistemática dos péptidos M dados, começando pelo aminoácido número um e seguindo, de modo a cobrir, de forma progressiva, toda a proteína (permitindo assim de cerca de 50% a cerca de 70% de sobreposição entre os diferentes péptidos; ver o seguinte Exemplo 4).

Em alternativa, os referidos péptidos M podem conceber-se começando por aquelas regiões que correspondem a segmentos de proteína próximos dos terminais de azoto e de carbono, assim como ao centro da proteína, permitindo outra vez a sobreposição entre os diferentes péptidos.

A etapa (b) compreende preparar os péptidos M de acordo com processos bem conhecidos na técnica. Os referidos processos podem incluir, como um exemplo, qualquer processo sintético conhecido para a síntese de péptidos ou, em alternativa, a possibilidade de tomá-los directamente da proteína, cortando-a nos sítios adequados, por processos conhecidos.

A etapa (c) efectua-se dissolvendo qualquer dos péptidos preparados na etapa (b) juntamente com a proteína alvo em qualquer dissolvente adequado. A proporção molar entre o péptido e a proteína pode variar de forma adequada no intervalo de 1:1 a 10:1 (péptido/proteína); de um modo preferido, a concentração relativa de péptido/proteína é de 3 a 1.

As soluções assim obtidas são incubadas a cerca de 37 °C durante uns minutos, por exemplo, até 10 minutos.

Em alternativa, as etapas b) e c) podem substituir-se por simulações por computador em que se utilizam modelos simplificados de proteínas (e.g., o modelo de Gō de todos os átomos, modelo de Gō de C_α etc. [33]) acopladas com amostras termodinâmicas ou de dinâmicas simuladas (e.g., algoritmo de Monte Carlo, Dinâmica de Newton, etc.) para simular a evolução da proteína em presença de cada tipo de péptido (partindo das conformações da proteína desdobrada ou dobrada) e determinar, assim, o grau de desdobragem da própria proteína na presença destes péptidos.

Estas simulações podem proporcionar informação, não só da sequência dos inibidores, que é igual a um segmento da proteína, mas também da sua conformação nativa no solvente. São preferidos os que apresentam um elevado grau de estrutura e estabilidade, comparado com os inibidores que apresentam pouca estrutura e/ou grandes flutuações. Isto está de acordo com o facto de que se espera que os inibidores muito estruturados (que correspondem às chamadas estruturas elementares locais (LES) "fechadas", i.e., segmentos de motivos que apresentam contactos nativos importantes na estabilidade da proteína) sejam mais específicos e, portanto, menos tóxicos que outros menos estruturados, chamados LES

“abertas” [11,12,15]. Sobre isto vale a pena indicar que os cálculos de modelos que só consideram os átomos C_{α} dos resíduos, enfatizam as diferenças que existem entre estes dois tipos de LES.

Quando existe informação experimental sistemática relativa aos valores ϕ [4] associados a um grande número de sítios da proteína, de modo a permitir uma determinação dos sítios “têpidos” e “quentes” da proteína (*i.e.*, aqueles sítios que têm uma função central no dobragem da proteína [16], sendo os aminoácidos correspondentes que os ocupam altamente conservados), pode finalmente ajustar-se ligeiramente o comprimento e o número de aminoácidos inicial e final ao longo da proteína de modo que se garante que os inibidores peptídicos incluem todos os aminoácidos quentes e a maioria, se não todos, os aminoácidos têpidos.

O processo de iteração também se pode efectuar calculando os valores ϕ associados aos diferentes aminoácidos da proteína alvo, utilizando um software adequado (ver Exemplo 1 seguinte). Uma vez que se tenham concebido os novos inibidores, também se pode ensaiar a sua eficácia através dos ensaios da etapa (d) anterior.

De acordo com a etapa (d) do presente processo da invenção, a eficácia inibidora do péptido ou o grau de desdobragem, ou ambos, nas soluções anteriores, pode efectuar-se de acordo com processos convencionais. Como um exemplo não limitativo, os ensaios espectrofotométricos, ensaios de equilíbrio de sedimentação, dicroísmo circular ou técnicas de ressonância magnética nuclear, podem utilizar-se e efectuar todos para determinar o efeito inibidor anterior.

Do mesmo modo, são conhecidas experiências de absorção na técnica [4] para determinar a eficácia inibidora quando a proteína é uma enzima [4,31].

Tal como anteriormente referido, uma vez que se tenha encontrado um péptido que bloqueia eficazmente a dobragem da proteína, não é necessário *a priori* continuar com o processo de comprovar as propriedades inibidoras do resto dos péptidos e a pesquisa e identificação podem terminar nesse ponto.

Por outras palavras, o processo da invenção pode ser aplicado para identificar o péptido óptimo dotado da mais elevada actividade inibidora entre todos os péptidos M que estão a ser preparados e assim ensaiados.

Em alternativa, como se referiu acima, as diferentes soluções da etapa (c) podem ensaiar-se em qualquer ordem e todo o processo parado uma vez que se tenha encontrado um péptido que tenha a actividade inibidora pretendida, sem necessidade de ensaio e, portanto, de preparar todas as soluções.

Assim, de acordo com uma forma de realização alternativa da presente invenção, a etapa (a) pode compreender conceber um único péptido com um comprimento que varia de 4 a 20; a etapa (b) pode compreender a preparação do referido péptido; a etapa (c) pode compreender a preparação de uma solução da proteína com esse mesmo péptido; a etapa (d) pode compreender avaliar a actividade inibidora do péptido. No caso de se verificar que a eficácia inibidora do referido péptido é satisfatória, o processo pode terminar, dado que permitiu identificar facilmente o inibidor peptídico adequado. Pelo contrário, se não for satisfatório ou se o péptido, de algum modo, carece de alguma eficácia inibidora

significativa, as etapas (a) a (d) podem repetir-se com outro péptido até à identificação do óptimo.

Os poucos péptidos (1-4) que inibem a dobragem da proteína e a que chamamos p-LES, identificam os segmentos de aminoácidos da proteína que, no processo de dobragem, dão lugar às LES.

Dado que, para cumprir a sua actividade biológica, uma proteína deve estar na conformação nativa (dobrada), espera-se que os p-LES também sejam inibidores efectivos, eficazes e específicos de forma perdurável das funções de proteína.

Deve ensaiar-se a solubilidade dos p-LES no meio de cultura e pode modificar-se para reduzir a sua hidrofobicidade, caso seja necessário.

A modificação pode ocorrer, por exemplo, através de: 1) adição de aminoácidos polares e/ou carregados; 2) encurtamento da cadeia, isto é, perda de um ou dois aminoácidos hidrófobos nas extremidades C ou N ou em ambas; 3) mutações conservativas, isto é, substituindo um aminoácido hidrófobo por outro aminoácido um pouco menos hidrófobo.

Além disso, dado que os p-LES são péptidos, também podem ser digeridos pelas células e/ou criar alergias.

Neste caso, os p-LES podem ser utilizados como pistas dos inibidores de dobragem correspondentes às suas moléculas miméticas ou finalmente péptidos da mesma sequência de aminoácidos sintetizados utilizando aminoácidos-D, por processos conhecidos.

A título de exemplo, descrever-se-ão agora, com mais pormenor, diferentes aspectos e formas de realização da presente invenção, com referência também a péptidos miméticos e solubilidade de p-LES.

Os referidos exemplos não devem considerar-se limitativos da presente invenção, uma vez que se observará que se podem aplicar modificações de pormenores do processo sem sair do âmbito da invenção.

Figuras:

Figura 1: Um desenho da estrutura cristalográfica de src SH3. As (cinco) folhas-beta antiparalelas são representadas por meio de tiras com setas (cinzento claro), enquanto a hélice alfa é evidenciada em cinzento-escuro;

Figura 2: A probabilidade de distribuição no equilíbrio do parâmetro de ordem q definido como o número relativo de contactos nativos, calculado a três temperaturas diferentes para a proteína SH3 isoladamente. A proteína está na conformação nativa para os valores $q > 0,7$ e no estado desnaturado para $q < 0,5$. A temperatura $T = 0,843$ à qual os picos dos estados nativo e desnaturado têm a mesma área é a temperatura de dobragem;

Figura 3: A probabilidade de distribuição no equilíbrio a $T = 0,825$ do parâmetro de ordem q para o sistema composto pelo domínio de proteína Src-SH3 e três péptidos com a mesma sequência que um dos segmentos de proteína caracterizados pelo primeiro e último aminoácidos apresentados na inserção;

Figura 4: A probabilidade de distribuição no equilíbrio do parâmetro de ordem q calculada a $T= 0,825$ para o sistema composto pelo domínio de proteína Src-SH3 e três péptidos com a mesma sequência que um dos fragmentos de proteína caracterizados pelo primeiro e último aminoácidos apresentados na inserção;

Figura 5: A população do estado nativo a $T= 0,825$ para um sistema composto pelo domínio de proteína Src-SH3 e três péptidos cuja sequência é idêntica à do fragmento da proteína de comprimento 6 que começa no sítio indicado no eixo de abcissas, normalizado em relação à população do estado nativo da própria proteína ($p_N^{\text{sem-p-LES}}$). Os péptidos começam com o segmento 1-6 e terminam com o segmento 55-60, sendo a sobreposição entre os diferentes péptidos de 67%. A linha é para guiar a vista. Os pontos abertos dão informação das propriedades inibidoras dos péptidos $p-S'_2$ (=18-28) e $p-S'_3$ (=36-42) obtidos por ligeira modificação dos dois péptidos originais, em concreto os péptidos $p-S_2$ (=21-27) e $p-S_3$ =(35-40) (ver o texto).

Figura 6: A população do estado nativo do domínio de proteína Src SH3 (pontos brancos) a $T= 0,825$. Os resultados apresentados para o valor 0 do eixo de abcissas correspondem à sequência nativa. Os outros resultados correspondem à proteína que tem uma mutação nos sítios 9, 30 (frio, C), 5, 49 e 55 (tépido, W), e 18, 26 (quente, H). A população relativa do estado nativo do domínio de proteína Src SH3 a $T= 0,825$ em presença de três $P-S_3$ (35-40) mostra-se em termos de triângulos negros. As linhas são para guiar o observador. Os valores nos diferentes sítios de mutação correspondem à sequência nativa da proteína que leva a mutação indicada no eixo de abcissas.

Figura 7: A variação ΔG de energia livre depois da mutação de Src-SH3 calculada usando um modelo de G \ddot{o} modificado. Também se mostra o valor de $[\Delta G]$ e $[\Delta G]+2\Delta$. Os sítios com $\Delta G > [\Delta G]+2\Delta$ (n $^{\circ}$ 18, 26, 27 e 40) chamam-se aminoácidos quentes, enquanto os com $[\Delta G] < \Delta G < [\Delta G]+2\Delta$ (n.º 4, 5, 6, 28, 39, 41, 48, 49, 50 e 55) se qualificam como aminoácidos tépidos. Os cálculos sistemáticos e a informação experimental indicam que os sítios “tépidos” e “quentes” de proteínas mono globulares de domínio único estão presentes nas relações anteriormente mencionadas (ver [40] e referências na mesma).

Figura 8: Igual à Fig. 7 mas para os valores de G_{U-N} determinados experimentalmente por engenharia de proteínas [32]. Neste caso, os sítios 10, 20, 24 e 26 são sítios quentes, enquanto os sítios 5, 7, 18, 23, 38, 41, 44, 48, 49 e 50 se qualificam como sítios tépidos.

Figura 9: Um desenho da conformação nativa do homodímero de HIV-1-PR. Cada monómero contém 99 aa. Os dois monómeros são mostrados com diferentes níveis de cinzento. No monómero apresentado à direita destacam-se em cinzento-escuro os possíveis candidatos de LES associadas a este monómero [37].

Figura 10: O efeito das mutações numa série de sítios do monómero de HIV-1-PR (eixo x) na estabilidade p_N do estado nativo da proteína (eixo y), calculado utilizando um modelo generalizado de C G \ddot{o} [37]. As cruzes negras correspondem à estabilidade da conformação nativa do monómero isoladamente (à temperatura biológica $T= 2,5$ kJ/mol), enquanto os pontos negros dão o valor de p_N do monómero na presença de três p-LES de tipo p-S $_8$ (=83-93). O ponto negro e a cruz desenhados no sítio de mutação= 0 indicam

os resultados associados à sequência nativa. As linhas são para guiar o observador.

Figura 11: A absorvência da actividade de referência de HIV-1-PR como uma função do tempo na presença do péptido 83-93 (1), de péptidos não inibidores (2), dos péptidos 61-70 (3) e dos péptidos 9-19 (4) (da referência [36]).

Exemplos

Exemplo 1 (Src-SH3)

Este domínio apresenta cinco folhas-beta antiparalelas e uma hélice alfa e é composto por 60 resíduos (ver Fig. 1).

É uma referência interessante para o processo da invenção, dado que se caracterizou amplamente por experiências termodinâmicas assim como cinéticas [32].

Utilizando um modelo generalizado de Gō [33], efectuaram-se simulações da dobragem do domínio SH3 e calculou-se a probabilidade de que o domínio esteja na sua conformação nativa (ver a Fig. 2). Repetiram-se os cálculos que evoluem em cada caso o domínio SH3 na presença de um péptido que apresenta uma sequência igual a um dos 28 segmentos da proteína de comprimento $N/10$ ($=6$), em concreto 1-6, 3-8, 5-10, ..., 55-60, na relação de péptido-domínio 3:1. Os resultados são mostrados nas Figs. 3, 4 e 5.

A partir destes resultados pode assinalar-se claramente que a dobragem é inibida pelos péptidos $p-S_1= 3-8$, $p-S_2= 21-27$, $p-S_3= 35-40$ e $p-S_4= 45-50$, sendo o péptido $p-S_3$ o mais eficaz.

Por conseguinte, os segmentos S_i ($i= 1, 2, 3$ e 4) qualificam-se como LES do domínio SH3.

O facto de os péptidos $p-S_i$ ($i= 1, 2, 3$ e 4) não serem só inibidores eficazes, mas também permanentemente eficazes é documentado pelos resultados apresentados na Fig. 6.

Na Fig. 6 descreve-se o efeito que as mutações pontuais têm na estabilidade da própria proteína e na presença de três péptidos $p-S_3$. As mutações que não afectam a estabilidade nem a capacidade de dobragem da proteína (e.g., mutação nos sítios n.º 9 e n.º 30) deixam sem alteração a capacidade inibidora do péptido $p-S_3$. Por outro lado, os mutantes de libertação (e.g., mutações nos sítios n.º (5, 18, 26, 49 e 55)) não são capazes de dobragem. Estes resultados estão de acordo com o facto de que os sítios n.º (9, 30), n.º (5, 49, 55) e n.º (18, 26) se qualificam como sítios frios, tépidos e quentes, respectivamente.

Combinando os resultados apresentados nas Figs. 5 e 7, pode ajustar-se ligeiramente o comprimento e o número de aminoácidos inicial e final dos quatro inibidores $p-S_i$ ($i= 1, 2, 3$ e 4), com o fim de assegurar que incluem todos os sítios quentes (sítios n.º 18, 26, 27 e 40) e a maioria os sítios tépidos (4, 5, 6, 28, 39, 41, 48, 49, 50, 55). Um possível resultado de uma primeira iteração levada a cabo ao longo destas linhas da: $p-S_1= p-S'_1= 3-8$ (contendo os aminoácidos tépidos 4, 5 e 6), $p-S'_2= 18-28$ (aminoácidos quentes 18, 26, 27; aminoácido tépido 28), $p-S'_3= 36-42$ (aminoácido quente 40; aminoácidos tépidos 39, 41), $p-S'_4=$

p-S₄= 45-50 (aminoácidos tépidos 48,49,50). Observa-se que só um aminoácido (tépido) (n.º 55) não é englobado/incluído neste conjunto de péptidos inibidores. Isto está de acordo com o facto de que nem todos os sítios tépidos, que participam no FN (pós-crítica) pertencem necessariamente às LES (e.g., o aminoácido tépido n.º 16 da proteína modelo S₃₆ é parte do FN pós-crítica, mas não pertence a nenhuma LES [16]). A eficácia melhorada dos péptidos iterados ilustra-se pelos resultados apresentados na Fig. 5 para p-S₂' e p-S₃' (pontos abertos).

Vale a pena notar que todos os resultados descritos até agora surgem de cálculos de modelos. Devido ao facto de, no presente caso, (domínio de proteína Src-SH3) existir informação experimental pormenorizada relativa aos aminoácidos que apresentam uma função importante no processo de dobragem (isto é, conhecem-se os valores de $\Delta\Delta G$ da engenharia de proteínas [32], ver Fig. 8), pode-se aproveitar esta informação para levar a cabo o processo de iteração.

A partir dos resultados apresentados na Fig. 8, deve assinalar-se que os sítios "quentes" e "tépidos" correspondem aos aminoácidos n.º 10, 20, 24, 26 e aos aminoácidos n.º 5, 7, 18, 23, 38, 41, 48, 50, respectivamente.

Utilizando estes resultados e os apresentados nas Figs. 5 e 6, verifica-se que uma possível primeira iteração da p-S₁'= 5-10 (contendo o aminoácido quente 10, e os aminoácidos tépidos n.º 5, 7), p-S₂'= 20-26 (aminoácidos quentes n.º 20, 24, 26; aminoácido tépido n.º 23), p-S₃'= 38-44 (aminoácidos tépidos n.º 38, 41, 44) e p-S₄'= p-S₄= 45-50 (aminoácidos tépidos n.º 48, 50).

As propriedades inibidoras destes péptidos determinadas pelo enfoque anterior devem ensaiar-se pelos ensaios citados na etapa (d) do processo da invenção.

Exemplo 2 (HIV-PR, computacional)

O HIV-1-PR é um homodímero formado por cadeias contendo 99 aa cada (Fig. 9). As propriedades de estabilidade desta enzima foram estudadas por meio de simulações extensas de todos os átomos ao longo de centenas de nanossegundos (ns). Utilizando os correspondentes resultados desenvolveu-se um modelo de C Gō. Depois utilizou-se para simular a evolução dinâmica completa da dobragem da enzima e compararam-se os resultados com os das simulações de modelo de Gō padrão de todos os átomos disponíveis na bibliografia. Combinando o entendimento obtido destas simulações e a informação proveniente das mutações (Tabela 1), determinaram-se os sítios “quentes” e “tépidos” da proteína e seleccionaram-se os possíveis candidatos das LES. Em particular, a região $S_8=(83-93)$ (para pormenores ver [37] e as referências na mesma).

As simulações da dobragem do monómero de HIV-1-PR foram efectuadas na presença de três péptidos p- S_8 . Definindo a população p_N do estado nativo como a probabilidade normalizada de que a cadeia apresente uma RMSD inferior a 10 Å e mais de 70% dos contactos nativos formados, verifica-se que $p_N = 0,28$. Este número deve comparar-se com $p_N = 0,87$ para a proteína isoladamente nas mesmas condições biológicas e com os números $p_N = 0,72$ e $0,66$ para a proteína em presença de péptidos de controlo que têm a mesma sequência que o fragmento 61-71 e 4-14) [37].

Na Fig. 10 mostra-se a prova do facto de este inibidor não criar resistência. As mutações que não afectam a estabilidade nem a capacidade de dobragem da proteína deixam essencialmente sem alterações as propriedades inibidoras do péptido p-S₈ (e.g., mutação no sítio n.º 19). As mutações de libertação (e.g., mutação no sítio n.º 33) essencialmente não podem dobrar-se.

Exemplo 3 (HIV-PR, experimental)

Obtiveram-se péptidos que apresentavam uma sequência idêntica aos segmentos 83-93 (S₈) e aos segmentos 9-19 e 61-70 do monómero de HIV-1-PR nativo por síntese em fase sólida. Cada solução foi preparada por adição de NaCl 0,8 mM, EDTA 1 mM e ditiotreitól 1 mM a um tampão de fosfato 20 mM (pH 6), acrescentando ainda 2,78 µg de Protease de HIV-1 e péptido 5,4 µM (*i.e.*, a concentração de cada dos diferentes péptidos é 3 vezes a da protease).

Os ensaios espectroscópicos foram efectuados utilizando um substrato cromógeno [34], medindo a sua alteração de absorvência em relação ao tempo a 310 nm [36]. Alguns dos resultados correspondentes são dados na Fig. 11. Vê-se que o péptido 83-93 diminui de modo regular a actividade da protease e portanto pode utilizar-se como inibidor. Assim, esta sequência pode interpretar-se como dando lugar a uma LES de HIV-1-PR. Como se observa na Fig. 9, esta LES é bem estruturada e contém um número de contactos nativos internos (que estabilizam uma volta de hélice alfa). Qualifica-se, portanto, como um inibidor peptídico particularmente específico. Vale a pena mencionar que se verifica que as mutações observadas neste fragmento [35] ou no seu fragmento complementar (*i.e.*, fragmento 24-34) são mutações

conservativas, quer sejam ou não induzidas por fármacos comerciais (dirigidos à inibição do sítio activo da protease) (ver Tabela 1).

Tabela 1: As mutações observadas de HIV-1-PR como se descrevem na referência [35]. Para cada resíduo da sequência nativa (WT) listam-se as mutações observadas nos doentes tratados e/ou não tratados (mut) e a pontuação de PAM250 associada com a menos conservativa destas mutações (PAM250 é uma pontuação derivada da análise de substituições de aminoácidos que se produzem entre proteínas relacionadas. Especifica um intervalo de valores positivos para as substituições que se produzem normalmente entre proteínas relacionadas (mutações conservativas) e zero ou pontuações negativas para substituições não prováveis (mutações não conservativas)). A negrito referem-se os sítios que sofrem mutações não conservativas.

wt	mut	PAM	wt	mut	PAM	wt	mut	PAM	wt	mut	PAM
PI			T26			G51			L76	V	2
Q2			G27			G52			V77	I	4
I3	V	4	A28			F53	L	2	G78		
T4			D29			I54	VMLT	0	P79	A	1
L5			D30	N	2	K55	RH	0	T80		
W6			T31			V56			P81	T	0
Q7			V32	I	4	R57	K	3	V82	TAFIS	-1
R8	KQL	1	L33	FVI	2	Q58	E	2	N83		
P9			E34	DQANG	0	Y59			I84	V	4
L10	FIRV	-3	E35	DG	0	D60	E	3	I85	V	4
V11	IL	2	M36	ILV	2	Q61	ENH	1	G86		
T12	SPAEIKN	0	S37	DSTEKHC	-4	I62	V	4	R87	K	
I13	V	4	L38	F	2	L63	PSTACQH	-6	N88	DS	1
K14	R	3	P39	SQT	0	164	VLM	2	L89	MVI	2
I15	V	4	G40			E65	D	3	L90	M	4
G16	EA	0	R41	KN	0	166	FV	1	T91		
G17	E	0	W42			C67	FS	-4	Q92	KR	1
Q18	H	3	K43	RT	0	G68			193	L	2
L19	ITVQP	-3	P44			H69	KQYRN	0	G94		
K20	MRTIV	-2	K45	IRN	-2	K70	RTE	0	bf	SF	-3
									A95		
E21			M46	F1LV	0	A71	TVI	-1	T96		
A22			I47	V	4	I72	VTLMER	-2	L97	V	2
L23	I	2	bf G48	V	-1	G73	STCA	1	N98		
L24	IVF	2	G49			T74	SAP	0	F99		
D25			I50	VL	2	V75	I	4			

Exemplo 4

Dada uma proteína que contém aminoácidos N , podem preparar-se péptidos de comprimento $L = (N/10) \pm 2$, que apresentem, cada um, a mesma sequência de um segmento da proteína. O péptido n.º 1 coincide com o segmento que começa com o aminoácido 1 e termina com o aminoácido L , o péptido n.º 2 coincide com o segmento $(L/z+1)-[(1+z)L/z], \dots$, enquanto o péptido i coincide com o segmento $(iL/z+1)-[(i+z)L/z]$, com $i = 1, 2, \dots, i_m$, onde $i_m = zN/L - z$. Por conseguinte, o número máximo de péptidos que se vão produzir é $i_m + 1$. A quantidade z controla a sobreposição permitida entre dos péptidos consecutivos. Os valores recomendados são $z = 2, 3$ que conduzem a 50% e 67% de sobreposição.

A título ilustrativo (realista) escolhem-se os valores $N = 100$, $L = 10$, $z = 3$. Obtém-se então $i_m = 27$ e 67% de sobreposição. O número que corresponde ao primeiro e ao último aminoácido de cada um dos 28 péptidos possíveis recolhe-se na Tabela 2.

Correlacionam-se estes resultados com o caso do monómero do dímero de HIV-1-PR e supõem-se três cenários diferentes que se seguem na pesquisa dos péptidos que inibem a dobragem: a) pesquisa ordenada começando pelo aminoácido (aa) 1 e prosseguindo até aa 100 (*i.e.*, começando pela extremidade N e prosseguindo até à extremidade C), b) pesquisa ordenada mas na ordem inversa (de 100 a 1, ou seja, da extremidade C a N), c) pesquisa aleatória começando pela extremidade N e pela extremidade C, assim como pelo meio da proteína, e depois afastando-se dessas regiões para cobrir toda a proteína. No primeiro caso seriam necessárias 26 tentativas para encontrar o inibidor p-LES (péptido n.º 26 da Tabela 2), no segundo caso 3 tentativas, enquanto no terceiro caso 12 tentativas (ver Tabela 2).

Tabela 2: Um exemplo de divisão da sequência de HIV-1-PR em péptidos. As colunas indicam, respectivamente, o número de identificação do péptido, o índice i (veja-se o texto), o fragmento correspondente na sequência de HIV-1-PR e (em números romanos) um exemplo de um ensaio de inibição não sequencial, partindo do centro da proteína e das extremidades C e N terminais essencialmente de forma simultânea. Neste caso a pesquisa termina após 12 etapas quando se ensaia o péptido n.º 26

<i>péptido n.º</i>	<i>i</i>	<i>intervalo</i>	<i>aleatório</i>
1	—	1-10	III
2	1	4-13	VII
3	2	8-17	XI
4	3	11-20	
5	4	14-23	
6	5	18-27	
7	6	21-30	
8	7	24-33	
9	8	28-37	
10	9	31-40	
11	10	34-43	
12	11	38-47	X
13	12	41-50	V
14	13	44-53	I
15	14	48-57	II
16	15	51-60	VI
17	16	54-63	IX
18	17	58-67	
19	18	61-70	
20	19	64-73	
21	20	68-77	
22	21	71-80	
23	22	74-83	
24	23	78-87	
25	24	81-90	
26	25	84-93	XII
27	26	87-97	VIII
28	27	91-100	IV

Referências

1. A.L. Horwich e J.S. Weissman, Deadly Conformations-Protein Misfolding in Prion Disease, *Cell* **89** (1997) 499
2. D.R. Booth e col., Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis, *Nature* **385** (1997) 787
3. D. Sidransky e M. Hollstein, Clinical implications of the p53 gene. *Annual Review of Medicine*, **47** (1996) 285
4. A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science*, Freeman, Nova Iorque (1999)
5. C. Branden e J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*, Garland, Nova Iorque (1999)
6. H. J. Dyson e P. E. Write, Peptide conformation and protein folding, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3** (1993) 60-65
7. L.C. Wu, R. Grandorri e J. Carey, Autonomous Subdomains in Protein Folding, *Prot. Sci.* **3** (1994) 396-371
8. E. Bai, J.S. Mulue, L. Mayne e S.W. Englander, Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange, *Proteins* **17** (1993) 75-86
9. R. Jaenicke, Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies, *Biochem.* **30** (1991) 3147-61

10. A. Wallqvist, G.W. Smithers e D.G. Covell, A cooperative folding unit in HIV-1 protease. Implications for protein stability and occurrence of drug-induced mutations, *Prot. Engin.* **11** (1998) 999-1005
11. R.A. Broglia e G. Tiana, Hierarchy of Events in the folding of model proteins, *J. Chem. Phys.* **114** (2001) 7267-7273
12. G. Tiana e R.A. Broglia, Statistical Analysis of Native Contact Formation in the Folding of Designed Model Proteins, *J. Chem. Phys.* **114** (2001)2503-2507
13. V.I. Abkevich, A.M. Gutin e E.I. Shakhnovich, Specific nucleus as the transition state for protein folding, *Biochem.* **33** (1994) 10026-10032
14. R.A. Broglia, G. Tiana e R. Berera, Resistance proof, folding-inhibitor drugs, *J. Chem. Phys.* **118** (2003) 4754-4758
15. R.A. Broglia e G. Tiana, Reading the three-dimensional structure of a protein from its amino acid sequence, *Proteins* **45** (2001), 421-427
16. G. Tiana, R.A. Broglia, H.E. Roman, E. Vigezzi e E.I. Shakhnovich, Folding and Misfolding of Designed Protein-like Folding and Misfolding of Designed Protein-like Chains with Mutations, *J. Chem. Phys.* **108** (1998) 757-761
17. D.B. Wetlaufer, Nucleation, Rapid Folding, and Globular Intrachain Regions in Proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70** (1973) 697-701

18. D.B. Wetlaufer, Folding of protein fragments, *Adv. Prot. Chem.* **34** (1981) 61-92
19. G.E. Schuly e R.H. Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer, Heidelberg (1979)
20. G.E. Schulz, Domain motions in proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1** (1991)883-888
21. K.A. Dill, Theory for the folding and stability of globular proteins, *Biochem.* **24** (1985) 1501-1509
22. J.S. Richardson, The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure, *Adv. Prot. Chem.* **34** (1981) 167-339
23. J. Janin e S.J. Wodak, Structural domains in proteins and their role in the dynamics of protein function, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **42** (1983) 21-78
24. D.S. Goodsell e A. J. Olson, Soluble proteins: size, shape and function, *Trends Biochem. Sci.* **18** (1993) 65-68
25. R.F. Doolittle, Reconstructing history with amino acid sequences, *Prot. Sci.* **1** (1992)191-200
26. P. Bork, Mobile modules and motifs, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2** (1992) 413- 421
27. A. L. Berman, E. Kolker e E. N. Trifonov, Underlying order in protein sequence organization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** (1994) 4044-4047

28. D. Xu e R. Nussinov, Favorable domain size in proteins, *Fold. Design.* **3** (1998)11
29. E. Shakhnovich, Proteins with selected sequences fold into unique native conformation, *Phys. Rev. Lett.* **72** (1994) 3907
30. G. Tiana e R.A. Broglia, Folding and design of dimeric proteins, *Proteins* **49** (2002) 82-94
31. C. Cantor and C. Schimmel, *Biophysical Chemistry*, W.H. Freeman and Co. (1994)
32. V.P. Grantcharova, D.S. Riddle, J.V. Santiago e D. Baker, Important role of hydrogen bonds in the structurally polarized transition state for folding of the src SH3 domain, *Nature Struct. Biol.*, **5** 714 (1998)
33. N. Gō, Theoretical studies of protein folding. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **12** 183-21(1983)
34. T.A. Tomaszek e col., Chromophoric peptide substrates for the spectrophotometric assay of HIV-1 protease, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 168, 274-280(1990)
35. R.W. Shafer, P. Hu, A.K. Patick, C. Craig e V. Brendel, Identification of biased amino acid substitution patterns in human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with protease inhibitors, *J. Virol.* **73** (1999) 6197-6202
36. R.A. Broglia, G. Tiana, D. Provasi, F. Simona, L. Sutto, F. Vasile e M. Zanotti, pendiente de publicación, Design of a folding inhibitor of the HIV-1 Protease, q-bio/0408013

37. R.A. Broglia, G. Tiana, L. Sutto, D. Provasi e F. Simona, Design of HIV-1-PR inhibitors which do not create resistance: blocking the folding of single monomers, q-bio/0504011

38. H. Maity, M. Maity, M.M.G. Krishna, L. Mayne e S.W. Englander, NMR characterization of residual structure in the denatured state of protein L, *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, **102** (2005) 4741-4746

39. Q. Yi, M.L. Salley-Kim, E.J. Alm e D. Baker, NMR Characterization of residual structure in the denatured state of protein L, *J. Mol. Biol.* **299** (2000) 1341-1351.

40. R.A. Broglia, G. Tiana e D. Provasi, Simple models of protein folding, *J. Phys. Cond. Mat.* **16** (2004) R111-R114

41. A.M. Lesk e G.D. Rose, Folding units in globular proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1981) 4304-4308

Lisboa, 24 de Junho de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a identificação de inibidores peptídicos da dobragem de uma proteína contendo aminoácidos N, cujo processo compreende:
 - a) conceber péptidos M de comprimento L normalmente da ordem de 10 e, em geral, no intervalo de cerca de 4 a cerca de 20, apresentando, cada, uma sequência idêntica a um segmento da proteína considerada, de modo a cobrir todo o comprimento da proteína com um determinado grau de sobreposição, em que M é um número inteiro que normalmente varia entre 5 e 50;
 - b) preparar os péptidos M concebidos individualmente ou em grupos;
 - c) preparar soluções M contendo cada a proteína em causa e um dos péptidos numa proporção molar adequada e incubar cada das soluções a 37 °C;
 - d) avaliar a eficácia inibidora do péptido nas soluções anteriores ou o grau de desdobragem, ou ambos, mediante técnicas convencionais, de modo a identificar o péptido dotado de actividade inibidora em relação à proteína.
2. Processo da reivindicação 1, em que N está compreendido desde 60 a 150.
3. Processo da reivindicação 1, em que o comprimento L do péptido está compreendido entre 4 e 20.

4. Processo da reivindicação 1, em que o comprimento do péptido corresponde a $L = N/10$.
5. Processo da reivindicação 1, em que a etapa (b) é efectuada sintetizando os péptidos M ou cortando de forma adequada a proteína alvo, de acordo com processos convencionais.
6. Processo da reivindicação 1, em que a proporção molar de péptido/proteína pode variar desde 1:1 a 10:1.
7. Processo da reivindicação 5, em que a proporção molar de péptido/proteína é 3 a 1.
8. Processo da reivindicação 1, em que as etapas (b) e (c) podem ser substituídas por simulações com programas de computador.
9. Processo da reivindicação 1, em que as etapas (b) e (c) são efectuadas através de ensaios espectrofotométricos, ensaios de equilíbrio de sedimentação, dicroísmo circular ou técnicas de ressonância nuclear magnética.
10. Processo da reivindicação 1, aplicado a cada domínio de proteínas de múltiplos domínios.

Lisboa, 24 de Junho de 2009

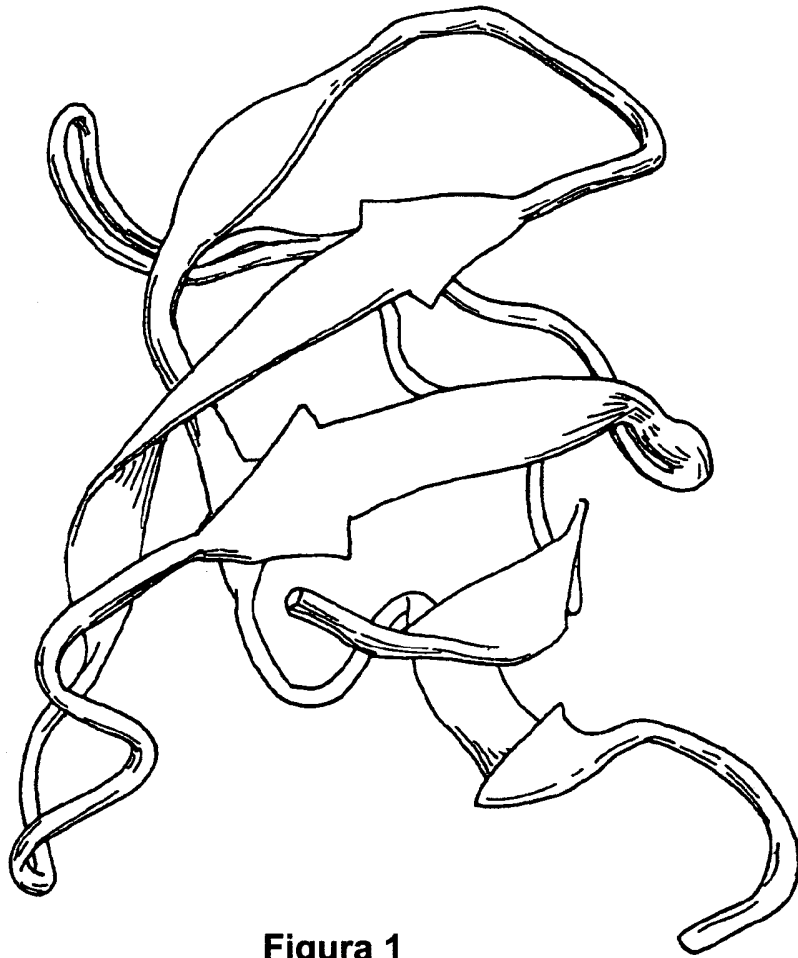


Figura 1

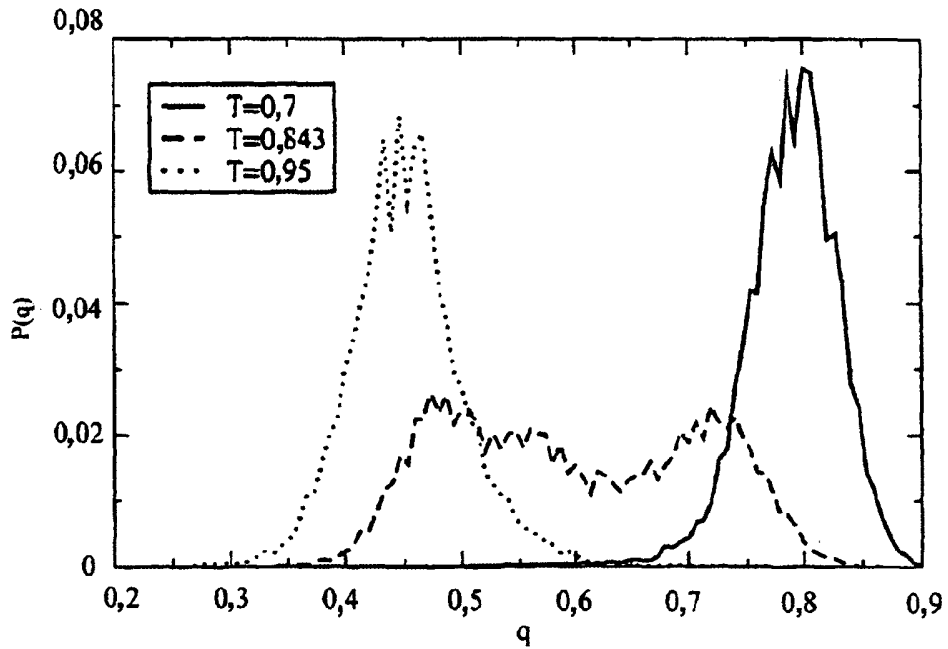


Figura 2

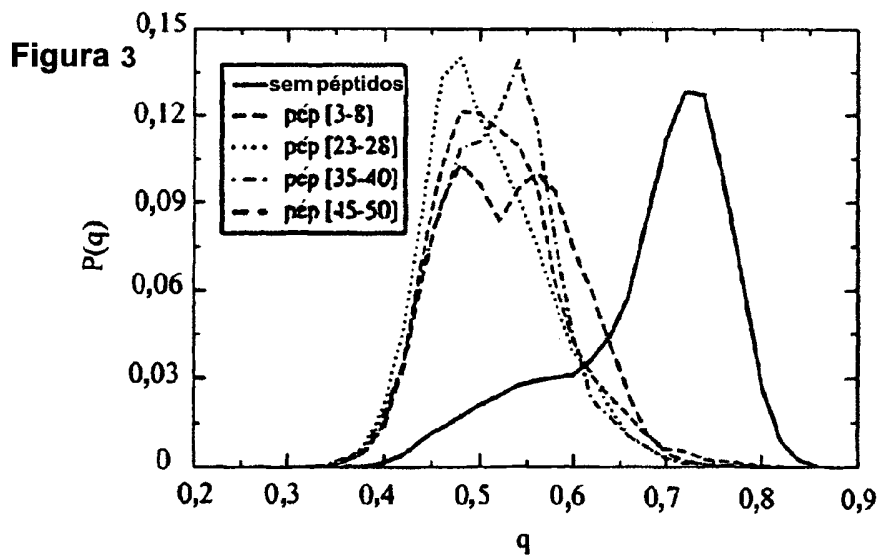


Figura 3

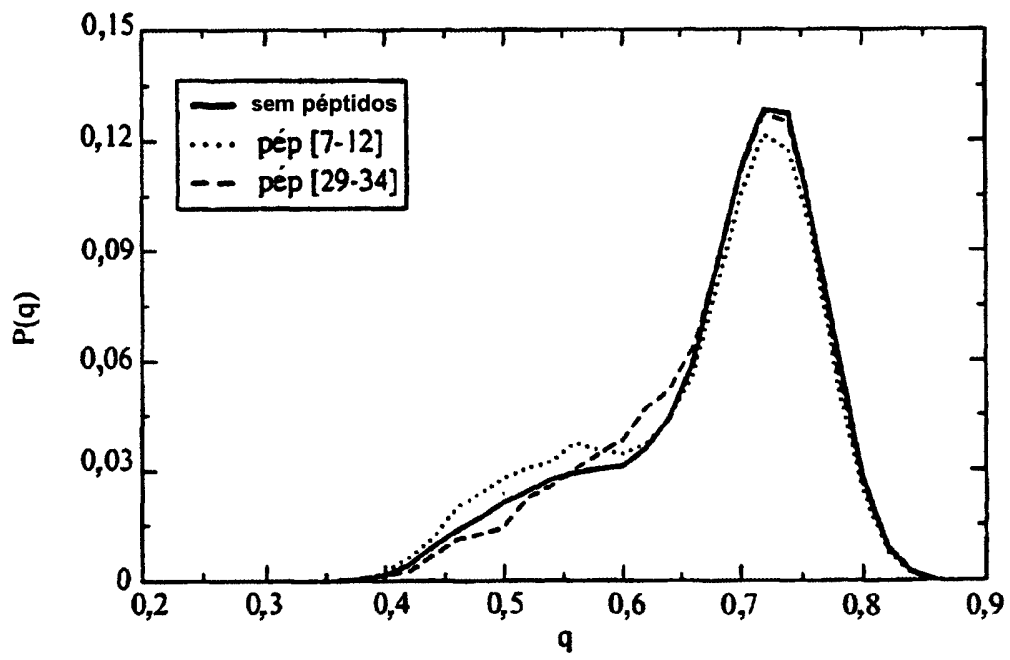


Figura 4

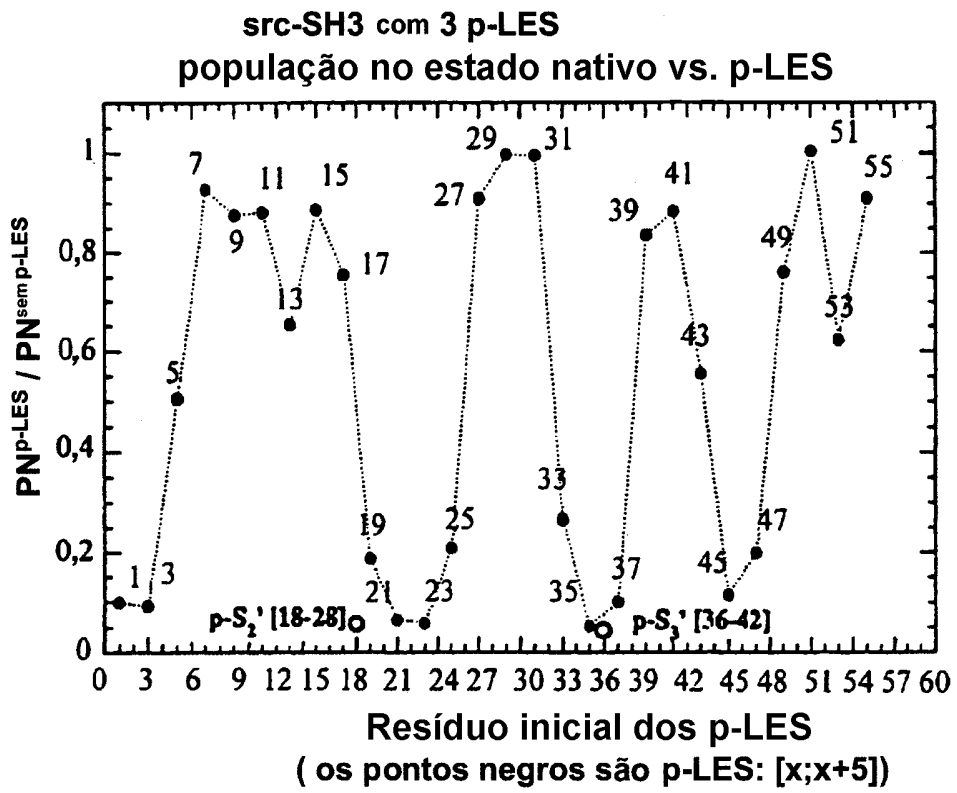


Figura 5

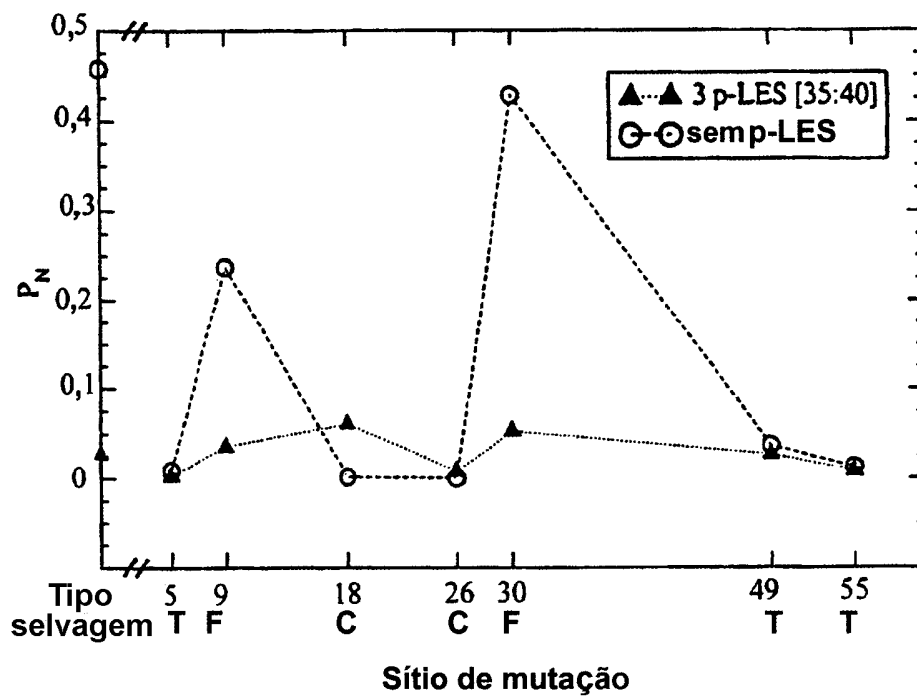


Figura 6

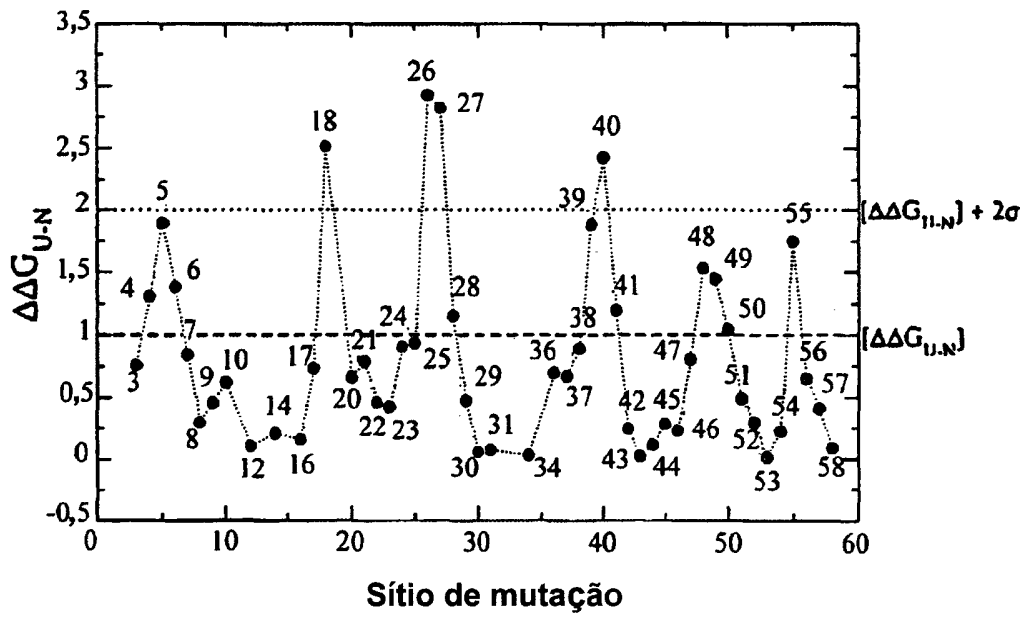


Figura 7

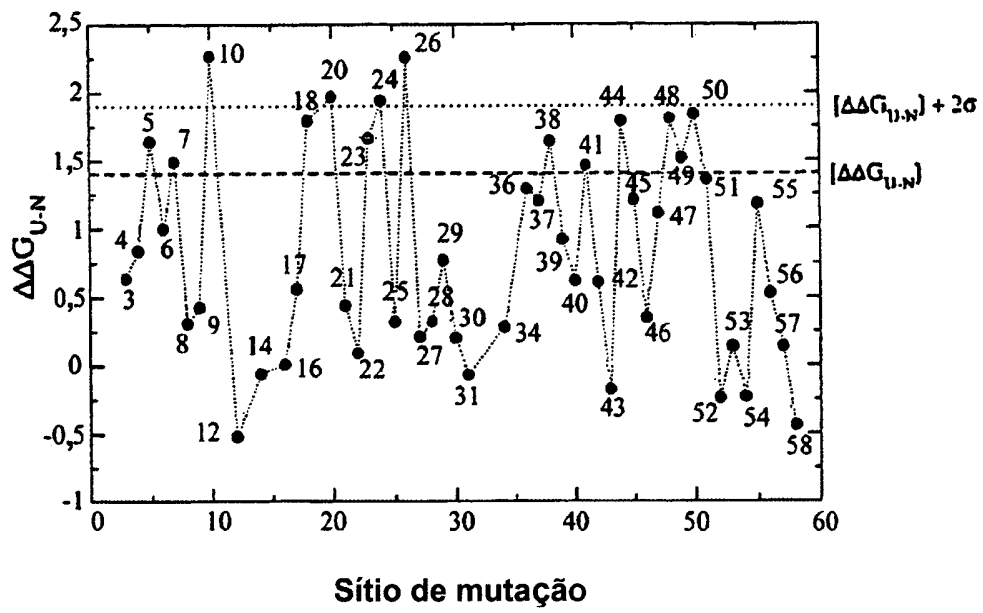


Figura 8

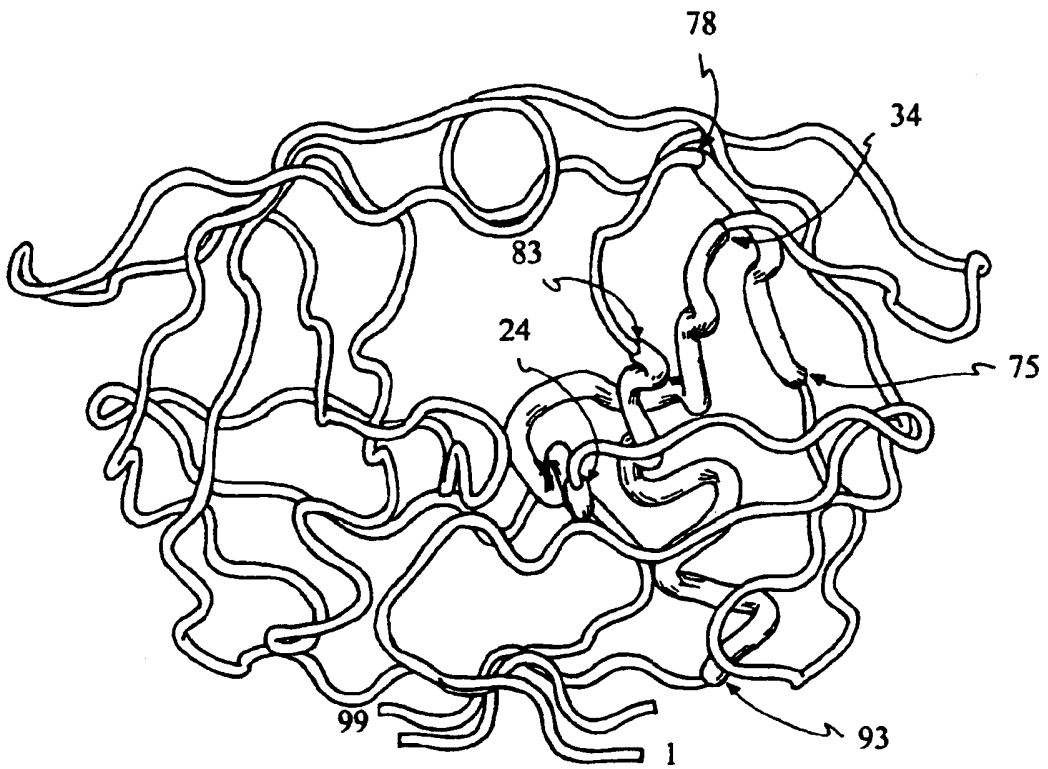


Figura 9

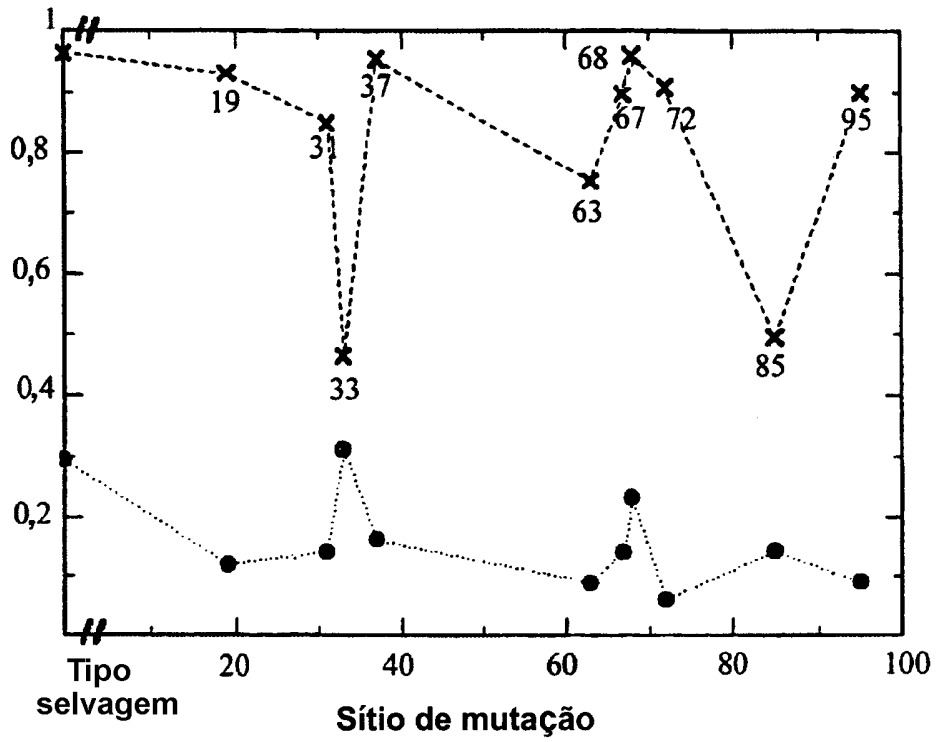


Figura 10

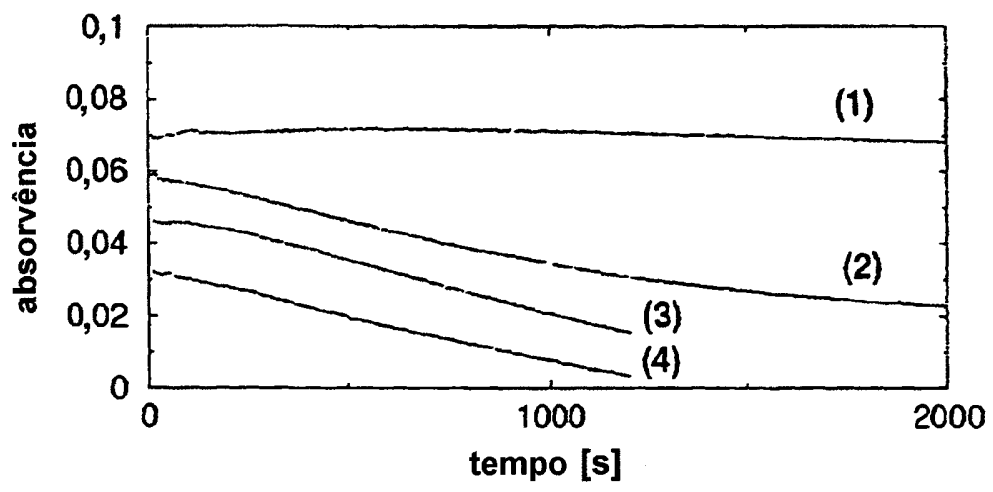


Figura 11

RESUMO

PROCESSO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DA DOBRAGEM DE PROTEÍNAS

A presente invenção refere-se a um processo para a identificação de inibidores peptídicos da dobragem e, portanto, da(s) função(ões) biológica(s) de proteínas que não criam resistência. Em particular, a invenção refere-se a inibidores de enzimas virais com uma taxa de mutação alta.