

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0618528-2 A2**

(22) Data de Depósito: 30/06/2006
(43) Data da Publicação: 17/04/2012
(RPI 2154)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 11/02
C12N 9/76
C12N 9/88

(54) Título: MÉTODO DE CONVERSÃO DE PROTEÍNAS ATIVAS SOLÚVEIS EM ÁGUA EM PROTEÍNAS ATIVAS HIDROFÓBICAS, USO DAS MESMAS PARA A PREPARAÇÃO DE CAMADAS MONOMOLECULARES DE PROTEÍNAS ATIVAS ORIENTADAS E DISPOSITIVOS COMPREENDENDO AS DITAS PROTEÍNAS

(30) Prioridade Unionista: 11/11/2005 EP
PCT/EP2005/055901

(73) Titular(es): Proteogen Bio S.R.L.

(72) Inventor(es): Elena Donadio, Ettore Balestrieri, Romano Felicioli

(74) Procurador(es): Magnus Aspeby & Claudio Szabas

(86) Pedido Internacional: PCT IB2006052203 de 30/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/054839de
18/05/2007

(57) Resumo: MÉTODO DE CONVERSAO DE PROTEÍNAS ATIVAS SOLÚVEIS EM ÁGUA EM PROTEÍNAS ATIVAS HIDROFÓBICAS, USO DAS MESMAS PARA A PREPARAÇÃO DE CAMADAS MONOMOLECULARES DE PROTEÍNAS ATIVAS ORIENTADAS E DISPOSITIVOS COMPREENDENDO AS DITAS PROTEÍNAS. A presente invenção se refere a um método para converter proteínas ativas hidrofílicas (HPiAP) em proteínas ativas hidrofóbicas (HPoAP), adequadas para a fixação na sua forma ativa sobre substratos hidrofóbicos. A presente invenção também se refere à preparação de camadas ordenadas rnomoleculares de proteínas ativas orientadas, mobilizadas sobre suportes sólidos hidrofóbicos, a serem usados na manipulação mecânica e em pesquisas, incluindo Microscopia de Força Atômica (AFM) em soluções aquosas e ensaios que utilizam os mesmos dispositivos.

**"MÉTODO DE CONVERSÃO DE PROTEÍNAS ATIVAS SOLÚVEIS EM ÁGUA
EM PROTEÍNAS ATIVAS HIDROFÓBICAS, USO DAS MESMAS PARA A
PREPARAÇÃO DE CAMADAS MONOMOLECULARES DE PROTEÍNAS ATIVAS
ORIENTADAS E DISPOSITIVOS COMPREENDENDO AS DITAS PROTEÍNAS"**

5

Campo Técnico da Invenção

A presente invenção se refere a um método de conversão de proteínas ativas, hidrofílicas, solúveis em água (HPiAP), em proteínas ativas hidrofóbicas (HPoAP),
10 através de modificações covalentes de resíduos superficiais aminoácidos hidrofílicos, com reagentes hidrofóbicos em fase heterogênea ou em uma mistura de solventes de diferentes polaridades. As proteínas hidrofobizadas espontaneamente se auto-constroem sobre diversos diferentes
15 suportes sólidos hidrofóbicos, em monocamadas estatisticamente orientadas, adequadas para a produção de biorreatores e biossensores e para manipulação e inspeções mecânicas, incluindo Microscopia de Força Atômica (AFM).

20 Antecedentes da Invenção

Uma grande variedade de pesquisas e/ou aplicações experimentais sobre bioengenharia exigem monocamadas de biomoléculas firmemente presas a um substrato sólido. O caso da Microscopia de Força Atômica (AFM) é o exemplo mais
25 evidente. O Microscópio de Força Atômica (AFM) permite a varredura de amostras fixadas sobre suportes sólidos ao nível de dimensões atômicas. Os sinais detectados pelo

cantiléver flexível,, após adequada ampliação, permitem a análise topográfica da amostra examinada. Portanto, a Microscopia de Força Atômica (AFM) permite o exame de amostras com dimensões nanoscópicas, isto é, entre 1 e 200 nm. Quando a varredura é executada em uma solução aquosa, é também possível analisar amostras biológicas sob condições fisiológicas. Entretanto, para a obtenção de imagens correspondentes à realidade é obrigatório que a amostra biológica examinada seja uniformemente fixada a um suporte, de modo que a ponta do microscópio não possa movimentá-la durante a execução da varredura. Além disso, a amostra deve, preferivelmente, ser organizada na forma de uma camada molecular.

Os métodos atualmente conhecidos para a preparação de camadas monomoleculares imobilizadas sobre um substrato hidrofóbico, que exploram interações hidrofóbicas, implicam no uso de moléculas naturalmente hidrofóbicas, consultar o artigo de Dawn S.Y. Yeo et al., "Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening" 2004, Vol. 7, No. 3, páginas 213-221, ou o uso de proteínas solúveis em água que adquirem propriedades hidrofóbicas de mudanças de conformação devido à temperatura, concentração iônica ou modificação de pH, consultar os artigos de Kapila Wadu-Mesthrige et al., "Journal Scanning Microscopy", 2000, Vol 22, páginas 338-388; Hyun J. et al., "J. Am. Chem. Soc" 2004, 126(23), páginas 7330-7335. Esses métodos não possuem seletividade, uma vez que as modificações físico-químicas podem também envolver o sítio ativo da proteína, com

conseqüente perda da atividade biológica natural.

Alternativamente, uma proteína hidrofobizada pode ser preparada através de processos de engenharia genética de proteínas solúveis em água, que, entretanto, são
5 bastante complexos e não garantem a conservação da atividade original, consultar os artigos de Hyun J. et al., (mencionado acima) ou de C. Tranchant et al., "Rev. Neurol. (Paris)" 1996, 152 (3), páginas 153-157.

Devido a essas razões, até agora tem sido
10 possível examinar com sucesso somente as proteínas de membrana, que são espontaneamente fixadas a uma camada dupla de lipídeo ou a complexos moleculares tendo altas dimensões. Imagens de proteínas solúveis não têm sido relatadas.

Portanto, o escopo da presente invenção é aquele
15 de prover novos métodos para tornar hidrofóbicas proteínas funcionais hidrofílicas solúveis em água, sem que seja afetada a função biológica natural da proteína, e meios que possibilitem a varredura, formação de imagem e manipulação
20 das proteínas solúveis em água.

Resumo da Invenção

A presente invenção se refere a métodos para a conversão de proteínas funcionais hidrofílicas, solúveis em
25 água (HPiAP) em proteínas hidrofóbicas (HPoAP), ao mesmo tempo em que se mantém a sua atividade biológica original. Os métodos implicam em modificações químicas assimétricas das proteínas hidrofílicas, isto é, introduzindo

modificações químicas sobre os resíduos superficiais aminoácidos situados numa parte da molécula mais distante ou oposta à parte responsável pela função da proteína. Este resultado é alcançado através da execução da reação com reagentes de "hidrofobização" em fase heterogênea ou em uma
5 mistura de solventes de diferentes polaridades.

A presente invenção se fundamenta no conhecimento de que a solubilidade em água das proteínas é devido ao equilíbrio do número de resíduos aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos que ocorrem na sua superfície. Em geral, nas
10 proteínas ativas, como as enzimas, uma área estendida de modo variável da superfície é delegada para interagir com pequenas moléculas solúveis em água de diferente natureza, notadamente, substratos, inibidores, cofatores e outros, isto é, o sítio ativo é principalmente hidrofílico.
15

O método da presente invenção explora a distribuição assimétrica da polaridade para direcionar a reação de modificação química necessária para trocar a natureza da proteína na área espaçada, a partir do sítio
20 ativo ou de modo oposto a esse sítio ativo.

As proteínas funcionais "hidrofobizadas" assim obtidas são depois imobilizadas ou presas sobre suportes sólidos hidrofóbicos, através de interações hidrofóbicas, a fim de se obter camadas monomoleculares orientadas de
25 proteína ativa.

O termo "orientada" usado na presente invenção significa que as proteínas imobilizadas são substancial e totalmente orientadas com a parte hidrofobizada da molécula

fixada à superfície do substrato, enquanto o sítio ativo livre se dispõe mais distante do ponto de fixação. O termo não significa que as moléculas imobilizadas mostram todas a mesma orientação espacial, que, ao contrário, é aleatória.

5 O termo "camada monomolecular" significa que as camadas obtidas são na maioria das vezes e preferivelmente "monomoleculares", embora a formação de áreas limitadas indesejadas de camadas multimoleculares nem sempre possa ser evitada.

10 Conseqüentemente, um primeiro objetivo da invenção é um método de preparação de uma proteína ativa hidrofóbica ou parcialmente hidrofóbica, conforme divulgado em quaisquer das reivindicações 1 a 6.

15 Um segundo objetivo da invenção é tornar uma proteína ativa naturalmente hidrofílica em uma proteína ativa hidrofóbica, conforme divulgado nas reivindicações 7 ou 8.

20 Um terceiro objetivo da invenção é um método de preparação de um dispositivo, conforme divulgado nas reivindicações 9 e 11, e o dispositivo assim obtido.

Outros objetivos da invenção são referentes a biorreatores ou biossensores compreendendo o dispositivo.

25 Ainda outros objetivos da invenção são os ensaios para pesquisar a conformação de uma proteína solúvel em água ou a conformação de seu complexo com um ligando ou a interação entre a proteína e um ligando ou candidato a ligando da mesma, conforme divulgado nas reivindicações 15 e 16.

O objetivo final da invenção é o uso do biorreator ou do biossensor como suporte reativo sólido para a preparação de microssistemas, para análise de diagnóstico, análise genética ou imunológica ou para
5 manipulação mecânica de proteína ou material genético, ou para o tratamento de líquidos ou gases.

Existem diversos fatores normalmente capazes de influenciar as funções de uma proteína ativa como uma enzima. Por exemplo, os efeitos de conformação quando
10 ocorrem modificações de conformação ou de distribuição de carga; efeitos estéricos, quando a interação do substrato com a enzima é afetada pelo impedimento estérico; efeitos de posicionamento, correlacionados à natureza química do material de suporte e ao microambiente modificado.

15 Portanto, é sabido da existência de uma expectativa a priori de que uma reação de hidrofobização pudesse modificar a cinética e outras propriedades da proteína ativa, por exemplo, afetando a atividade específica da enzima.

20 Entretanto, os resultados relatados nos exemplos mostraram que o método reivindicado elimina ou minimiza essa esperada perda de atividade.

Breve Descrição das Figuras

25 Figura 1. - A figura ilustra o desenvolvimento do tempo de 0 hora a 6 horas de hidrólise de BAPNA, provocado pela solução de tripsina/colesteril imobilizada em uma placa de silício.

Figura 2 - A figura relata a topografia da solução de tripsina/colesterol hidrofobicamente fixada em solução aquosa a uma placa de silício (área de varredura de 150 nm²). O quadro (A) mostra a imagem de uma área de 1 µm; o quadro (B) mostra a imagem da área de 150 nm; o quadro (C) representa a seção transversal da camada monomolecular.

Figura 3 - A figura relata a topografia da solução de tripsina/colesterol fixada em solução aquosa a uma placa de sílica (área de varredura de 50 nm²). O quadro (A) mostra a imagem da área de 50 nm; o quadro (B) mostra a seção transversal da camada monomolecular.

Figura 4 - A figura relata a topografia da solução de tripsina/colesterol fixada em solução aquosa a uma placa de sílica (área de varredura de 24 nm²). O quadro (A) mostra a imagem da área de 24 nm; o quadro (B) mostra a seção transversal da camada monomolecular.

Figura 5 - A figura relata o espectro de massa de água destilada (quadro superior) passada pelo dispositivo de ponta triptica funcionalizado: os picos de autólise da tripsina estão ausentes; e tripsina em solução (quadro inferior). Os picos da autólise são claramente evidentes.

Figura 6 - A figura ilustra o espectro de massa de Albumina de Soro Humano (HSA) (quadro superior) digerido por 10 minutos pelo dispositivo de ponta triptica funcionalizado: os picos de autólise estão ausentes enquanto os picos de HSA são totalmente presentes (quadro inferior). O HSA foi digerido durante a noite pela tripsina em solução: o círculo mostra um pico de autólise.

Figura 7 - A figura mostra a cinética de esvaziamento de quartzo induzida pelo bloqueio de moléculas de tripsina modificada de acordo com a estratégia II da invenção. A superfície do quartzo é coberta por uma lâmina de ouro bastante minúscula, tornada hidrofóbica por meio de tiocolesteróis.

Descrição Detalhada da Invenção

As proteínas ativas hidrófilicas (HPiAP) de acordo com a presente invenção são quaisquer proteínas solúveis em água selecionadas do grupo que consiste de enzimas, hormônios, receptores, antígenos, anticorpos, alérgenos, proteínas imunorreativas, parceiros de afinidade e quaisquer derivados, fragmentos e complexos funcionalmente equivalentes dos mesmos. Em particular, a proteína ativa pode ser qualquer enzima na sua forma natural, selecionada das classes gerais de oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Isto é, quaisquer das enzimas atualmente em uso na pesquisa básica e aplicada e com aplicação industrial, tais como, tripsina, aldolase de músculos, amilase, lipase, collagenase ou elastase.

Normalmente, na prática da modificação química de proteínas, tanto a proteína como os reagentes se encontram em solução aquosa (reação homogênea). Entretanto, duas restrições principais caracterizam a presente invenção: a proteína modificada, por exemplo, uma enzima, deve manter a sua atividade e os reagentes são pouco ou completamente

insolúveis em água.

Portanto, a fim de converter a proteína ativa hidrofílica em uma proteína hidrofóbica ou parcialmente hidrofóbica, ao mesmo tempo em que se mantém a sua funcionalidade, foram desenvolvidas duas diferentes estratégias, ambas objetivadas nas partes de "hidrofobização" da proteína mais distante ou oposta ao sítio ativo, que deve ser conservada na sua conformação e natureza nativa.

10

Estratégia I

Uma primeira estratégia implica em um sistema heterogêneo sólido/líquido. O sítio ativo e a área envolvente é reversivelmente protegido pela fixação do mesmo a uma matriz sólida, mediante cromatografia de afinidade. A fase sólida contém na sua superfície um ligando específico para o sítio ativo da proteína funcional. A etapa de "hidrofobização" é então realizada na proteína imobilizada. O reagente é dissolvido em uma solução aquosa tamponada usada como eluente, isto é, a fase líquida. Desse modo, a molécula de proteína é forçada a expor ao eluente apenas aquela parte distante do sítio ativo.

15
20

Qualquer matriz de afinidade comercialmente disponível adequada para cromatografia pode ser usada de acordo com a invenção, por exemplo, resinas à base de dextrano ou à base de celulose, tal como, fosfocelulose. Materiais conhecidos são adaptados com grupos funcionais

25

adequados para ligação de qualquer tipo de ligando, tais como, análogos de substratos, inibidores reversíveis, cofatores. Portanto, a preparação da fase sólida de afinidade e das condições para introdução da proteína hidrofílica e subsequente eluição da proteína hidrofóbizada são bem conhecidas para um especialista versado na técnica. A eluição é normalmente realizada mediante eluição por afinidade.

De acordo com o presente método, as moléculas acidentalmente modificadas nos resíduos aminoácidos de sítio ativo resultam separadas na etapa de eluição.

Estratégia II

Uma segunda estratégia implica numa mistura líquido/líquido, obtida mediante uso da proteína hidrofílica dissolvida em um solvente polar (normalmente água), com o reagente hidrofóbico dissolvido em um solvente menos polar, pelo menos parcialmente miscível em água. De acordo com as diferenças de polaridade entre os solventes e com os volumes envolvidos, são possíveis dois regimes de reação:

a) os dois solventes são parcialmente imiscíveis: duas fases microscópicas são geradas e a reação entre a proteína hidrofílica e o reagente hidrofóbico se realiza na interface entre as duas fases. Nessa situação, a proteína tende a orientar o seu sítio ativo na direção da fase polar, uma vez que o sítio ativo e suas vizinhanças constituem a região mais polar da superfície da proteína.

Os resíduos envolvidos na reação de hidrofobização são, portanto, localizados distantes do sítio ativo, dessa forma, preservando a atividade da proteína. Essa modalidade da invenção é menos preferida pelo fato de que a proteína
5 tende a se precipitar na interface, com resultante diminuição do rendimento final.

b) no regime preferido, os dois solventes são miscíveis. Nesse caso, são criados diferentes microambientes de solvatação na mistura, a nível molecular. A porção
10 hidrofóbica das moléculas reagentes é insolúvel no solvente polar e, depois, na mistura, é solvatada pelas moléculas do solvente menos polar. Por outro lado, as moléculas de solvente polar estão envolvendo o lado mais hidrofílico das moléculas de proteína. A reação de "hidrofobização" segue
15 um gradiente de polaridade: a região mais polar do reagente hidrofóbico tende a reagir com a região menos polar da proteína (isto é, a região distante do sítio ativo). Mesmo nesse caso, a probabilidade de um envolvimento dos resíduos pertencentes à região de sítio ativo é bastante baixa e,
20 portanto, a atividade é preservada.

Para ainda garantir a preservação de atividade, opcionalmente, é possível se proteger os aminoácidos responsáveis pela atividade ou engajados no seu reconhecimento e interação e os processos catalíticos são
25 aperfeiçoados mediante dissolução conjunta na mesma fase aquosa que protege as moléculas, tais como, substratos, análogos de substrato e/ou inibidores competitivos.

Após a reação, a proteína quimicamente modificada

pode ser adicionalmente purificada mediante cromatografia por interação hidrofóbica ou por meio de diálise ou por outros métodos de purificação.

O termo "solvente polar ou solução aquosa" significa qualquer solução em água, neutra para a função da proteína.

Pelo termo "solvente menos polar" é significado qualquer solvente bem conhecido, potencialmente solúvel ou insolúvel em água, por exemplo, alcoóis alquílicos, alquilaminas, alcanos halogenados, etc.

Modificação Química

Diversos resíduos aminoácidos possuem grupos funcionais na cadeia lateral, tais como, $-NH_2$, $-OH$, $-SH$ e, portanto, são adequados para reação com o reagente de hidrofobização; tais resíduos aminoácidos incluem Thr, Met, Trp, Lys, Arg, Asp, Cys, Glu, His, Ser, Tyr. Dessa lista, os aminoácidos tendo grupos amida na cadeia lateral e cadeias laterais de hidrocarbonetos e glicina foram excluídos, pelo fato de sua concentração relativamente baixa nas superfícies expostas da proteína e, ainda mais importante, pelo fato de sua cadeia lateral hidrofóbica não-reativa. Portanto, é previsível um grande número de possíveis modificações.

Qualquer modificação química causada por reagentes químicos capazes de converter um ou mais resíduos aminoácidos hidrofílicos em resíduos hidrofóbicos, ou capaz de fixar uma grande porção altamente hidrofóbica a um

adequado aminoácido polar, pode ser usada para converter a proteína hidrofílica solúvel em água em uma proteína hidrofóbica. Essa conversão pode ocorrer em resíduos aminoácidos idênticos ou diferentes.

5 Adequados reagentes de hidrofobização são os compostos químicos capazes de executar qualquer modificação covalente, incluindo, mas não sendo limitado a O-, N-, S-alquilação, O-, N-, S-acilação, ligação diazo, formação de ligação de peptídeo, arilação, formação de base de Schiff e
10 similares. Exemplos desses reagentes incluem os anidridos de acila, cloreto de acila, compostos diazo, aldeídos, cetonas, mas, também, compostos capazes de integrar grandes porções lipofílicas, tais como, cloroformiato de colesterol ou equivalentes.

15 A resultante proteína modificada é anfipática com maior hidrofobia que a forma natural, sendo caracterizada pela distribuição assimétrica de resíduos não polares/polares e mantendo sua solubilidade em água e sua funcionalidade original, uma vez que o sítio ativo foi
20 protegido no curso da reação.

De acordo com ambas as estratégias, o método pode compreender uma etapa adicional de separação das proteínas ativas hidrofobizadas da proteína inativada acidentalmente. Qualquer procedimento de purificação de proteína que
25 explora a afinidade da proteína por um substrato específico ou a maior hidrofobicidade das proteínas modificadas, pode ser usado para purificar o produto ativo. Tais procedimentos incluem a cromatografia por afinidade e os

procedimentos de eluição por afinidade ou lavagem com água das moléculas de proteína diretamente sobre o substrato de AFM hidrofóbico.

Existem diversos fatores normalmente capazes de influenciar as funções de uma proteína ativa como uma enzima. Por exemplo, os efeitos de conformação - quando ocorrem modificações de conformação ou modificações da distribuição de carga; efeitos estéricos - quando a interação do substrato com a enzima é afetada pelo impedimento estérico; efeitos de divisão, correlacionados à natureza química do material de suporte e ao microambiente modificado.

Portanto, foi criada a expectativa de que a hidrofobização de acordo com a presente invenção pudesse modificar a cinética e outras propriedades da proteína ativa, por exemplo, uma diminuição da atividade específica da enzima.

Ao contrário, os resultados relatados adiante nos exemplos mostram que o presente método reivindicado elimina ou minimiza a expectativa de perda de atividade.

Imobilização

As proteínas ativas hidrofobizadas obtidas de acordo com a presente invenção são adequadas para se ligarem a um substrato hidrofóbico, através de interações hidrofóbicas. Estas são resultantes de uma construção de camada ordenada, preferivelmente, uma camada monomolecular de proteína sobre a superfície do substrato. Além disso, as forças

hidrofóbicas se configuram como sendo suficientemente fortes para permitir a lavagem com água das moléculas não modificadas, dessa forma, disponibilizando meios de purificação altamente eficientes.

5 Adequados substratos hidrofóbicos incluem qualquer suporte naturalmente hidrofóbico ou tornado hidrofóbico por derivatização. Por exemplo, o substrato pode ser tornado hidrofóbico mediante revestimento do mesmo com lipídeos funcionalizados, tais como, lipídeos tiolados,
10 por exemplo, tiocolesteróis ou outros lipídeos equivalentes capazes de reagir com a superfície do substrato. Os substratos incluem, sem que seja a isso limitado, polímeros naturais, tal como, celulose ou polímeros sintéticos, tal como, PVC, poli(met)acrilatos, náilon, polietileno, teflon,
15 materiais de carbono, silício, vidro, resinas, partículas de metal ou folhas de metal, papel e similares. O suporte pode se apresentar na forma folheados, placas, lâminas, folhas, tubos, fibras, partículas, granulados, pós (de tamanho macro, micro ou nano) e podem apresentar uma base
20 atômica, superfície lisa ou superfície áspera.

O complexo feito pelas proteínas ativas hidrofobizadas, imobilizadas sobre o substrato hidrofóbico ou hidrofobizado é um dispositivo adequado para a preparação de biorreatores ou biossensores. Estes
25 dispositivos se apresentam na forma de folheados, placas, lâminas, folhas, tubos, partículas, fibras, granulados, pós (de tamanho macro, micro ou nano) "ativados".

Os dispositivos da invenção são instalados em

biorreatores ou biossensores. Por exemplo, os granulados de partículas ativadas podem ser usados para a construção de cartuchos empacotados em uma bancada de laboratório comum, ou para a construção de filtros empacotados em um envoltório ou em uma coluna. Placas, lâminas e folhas podem ser montadas em kits, para microssistemas de análise de diagnóstico, análise genética, análise imunológica ou para manipulação mecânica da proteína ou material genético.

Os presentes resultados mostram que as moléculas derivatizadas e fixadas não diferem de modo significativo, mas, sim, estruturalmente e funcionalmente das moléculas nativas. Os exemplos mostram que as enzimas mantêm a maior parte de sua atividade nativa.

As observações de AFM e dos ensaios de atividade enzimática das placas de sílica revestidas de enzima mostram que a conformação ativa é retida nas moléculas aderidas, enquanto que o aspecto homogêneo na varredura de AFM, junto com as dimensões calculadas da proteína modificada indicam que as moléculas inativas, ou erroneamente modificadas foram lavadas fora (ver as figuras 1, 2, 3 e 4).

Ainda mais importante é o fato de que as interações hidrofóbicas são tão fortes e estáveis que permitem um repetido uso do suporte revestido de proteína em um meio aquoso, por exemplo, ensaios enzimáticos repetidos.

Na medida em que as moléculas fixadas no suporte hidrofóbico são quimicamente modificadas em uma região que

não contém o sítio ativo, elas são, em meio aquoso, totalmente orientadas com o sítio ativo que reveste a fase aquosa. Esta é uma condição favorável para pesquisar em resolução atômica o mecanismo de interação da proteína
5 ativa com diversas pequenas moléculas, tais como, substratos, análogos de substratos, efetores alostéricos, inibidores, anticorpos, etc.

Além disso, uma vez que cada molécula de proteína é estavelmente fixada ao suporte, esta conformação fixa
10 previne ocasionais contatos entre as moléculas, assim, evitando indesejáveis reações prejudiciais. Portanto, contatos acidentais com moléculas (isto é, substratos, inibidores, efetores, etc.) que ocorrem na solução aquosa estão sob controle experimental. Essas condições tornam a
15 camada monomolecular ordenada de proteínas ativas orientadas, que suportam biorreatores ou biossensores, adequada para ser usada em medicina, industrialmente e em ambiente de química analítica. A presente invenção proporciona um fácil procedimento para a fabricação de tais
20 biossensores, usando as diversas centenas de enzimas solúveis em água ou outras proteínas ativas atualmente em uso, em qualquer campo de biologia aplicada.

A invenção também se refere a ensaios que fazem uso dos biorreatores e biossensores reivindicados, para
25 pesquisar a conformação de uma proteína ativa solúvel em água ou a conformação de seu complexo com um ligando, mediante formação de imagem de camada monomolecular de proteína imobilizada orientada e/ou seus complexos por meio

de Microscopia de Força Atômica (AFM). Esse tipo de ensaio é particularmente útil para pesquisar a interação entre uma proteína solúvel em água e candidatos a ligandos, a fim de identificar novos ligandos. As proteínas imobilizadas da invenção são também adequadas como suporte reativo sólido para a preparação de microssistemas destinados à análise de diagnóstico, análise genética, análise imunológica ou para manipulação mecânica de proteína ou material genético.

Finalmente, o protocolo de derivatização pode ser modificado a fim de se obter moléculas mais intensamente "hidrofobizadas" ou moléculas modificadas aleatoriamente em diferentes regiões superficiais, incluindo o sítio ativo. Um grande número de moléculas modificadas pode, dessa forma, ser obtido. No meio aquoso, todas as moléculas irão espontaneamente se dispor com uma orientação aleatória, de modo a formar uma camada sobre o substrato hidrofóbico. O uso contemporâneo de imagem de forma ativa e de imagens múltiplas orientadas diferentemente da mesma molécula irá permitir a reconstrução computadorizada precisa da imagem da molécula original sob investigação.

A invenção é ainda descrita em maiores detalhes nos exemplos seguintes, os quais são simplesmente idealizados para descrever modalidades específicas da invenção, sem qualquer limitação do seu escopo de proteção.

Os Exemplos 1 e 2 descrevem as duas estratégias gerais idealizadas pela invenção, para preparação do suporte revestido de proteína reivindicado, para aplicações de bioengenharia, em solução aquosa.

Duas enzimas nativas solúveis em água, a saber, aldolase de músculos e tripsina foram covalentemente modificadas *in vitro*, mediante alquilação de grupos de amina primária, para se obter moléculas anfipáticas.

5

Exemplo 1 (Estratégia I)

A HPiAP usada foi aldolase de músculo de coelho e o agente de alquilação foi anidrido acético. A derivatização foi realizada em uma fase heterogênea. A HPiAP foi absorvida por meio de cromatografia de afinidade em uma coluna de fosfocelulose (análoga ao substrato de 6-bisfosfato de frutose-1), reagida com a solução aquosa de percolação do anidrido acético e depois eluída com o substrato de 6-bisfosfato de frutose-1. A titulação dos resíduos de lisila indicou que 15 resíduos por molécula foram modificados. A HPoAP recuperada resultou ativa com parâmetros cinéticos não-variados. A atividade da aldolase foi testada de acordo com o método de Racker, usando 5-bisfosfato de frutose-1 como substrato e fosfato de gliceraldeído desidrogenase e triosofosfato isomerase como enzimas auxiliares (ver a Tabela I).

15

20

Tabela I

Parâmetro cinético	nativa	15 resíduos de lisila acetilados 25
V _{max}	2000	3200
K _m (μM)	23	22

Exemplo 2 (Estratégia II)

A HPiAP foi a tripsina e o agente de alquilação foi cloroformiato de colesteril em solução de propanol. A solução aquosa de tripsina foi misturada com a solução de propanol de cloroformiato de colesteril sob vigorosa agitação durante 30 minutos. Após o término da reação, a tripsina hidrofobizada foi coletada.

Após a reação, a proteína quimicamente modificada foi purificada por meio de cromatografia de interação hidrofóbica, usando resina de fenila HS, e eluindo com sulfato de amônio 0-30 mM em um tampão de Gly-HCl 20 mM. A fração que constitui o pico principal da proteína e de atividade foi usada para experimentos de imobilização. Após a derivatização, a atividade da tripsina foi testada em um pH 8, usando N α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) como substrato sintético. A HPoAP mostra uma completa atividade, parâmetros cinéticos não-variados e resíduos de 3-lisila modificados por molécula (ver a Tabela II, abaixo).

Uma quantidade de sílica gel foi imersa na solução de tripsina/colesteril, repetidamente lavada com água, imersa na solução de substrato sintético tamponada com BAPNA em pH 8, e incubada à temperatura de 37°C pelo tempo relatado. Uma placa de silício imersa na mesma solução foi usada como controle. A aparência da cor amarela indica que a solução de tripsina/colesteril fixada manteve a atividade proteolítica após diversas lavagens com água (ver a figura 1).

A enzima imobilizada foi ativa durante meses, conforme testado por métodos espectrofotométricos, usando BAPNA (N α -benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida) como substrato, indicando uma ligação hidrofóbica fortemente suportada entre a molécula de enzima anfipática e a placa de sílica hidrofóbica.

A placa de sílica revestida com a solução de tripsina/colesteril foi varrida por AFM em 10^{-8} N e 1000nm/s. A formação da imagem é relatada nas figuras 2, 3 e 4.

Tabela II

Parâmetro Cinético	nativa	3 resíduos de lisil/colesteril
Atividade Específica	1,1	0,90
K _m (μM)	1,67	1,68

Exemplo 3

A enzima Adenosina Deaminase foi hidrofobizada de acordo com a estratégia II de líquido/líquido da presente invenção. O agente de hidrofobização foi representado por cloroformiato de colesteril dissolvido em solução de propanol.

Exemplo 4

A enzima Citosina Deaminase foi hidrofobizada de acordo com a estratégia II de líquido/líquido da presente invenção. O esquema reacional foi similar ao do Exemplo 2.

Exemplo 5

A enzima Glutâmico-Oxaloacético Transaminase foi hidrofobizada de acordo com a estratégia I de líquido/sólido da presente invenção, usando resinas ligadas a fosfato de piridoxal como a fase sólida de cromatografia de afinidade.

Exemplo 6

A enzima Alanina-Piruvato Transaminase foi hidrofobizada de acordo com a estratégia I de líquido/sólido da presente invenção, usando resinas ligadas a fosfato de piridoxal como a fase sólida de cromatografia de afinidade.

Exemplo 7

A enzima Málica Desidrogenase foi hidrofobizada de acordo com a estratégia I de líquido/sólido da presente invenção, usando resinas ligadas a nicotinamida como a fase sólida de cromatografia de afinidade.

20

Exemplo 8

A enzima Álcool Desidrogenase foi hidrofobizada de acordo com a estratégia I de líquido/sólido da presente invenção, usando resinas ligadas a nicotinamida como a fase sólida de cromatografia de afinidade.

25

Exemplo 9

A enzima Lipase foi hidrofobizada de acordo com a estratégia I de líquido/sólido da presente invenção, usando resinas ligadas a acetato de propionila como a fase sólida de cromatografia de afinidade.

Exemplos de AplicaçãoExemplo 10

Um biorreator de utilidade para digerir proteínas em solução é produzido mediante derivatização de tripsina bovina, como no Exemplo 2 e bloqueando a mesma em grânulos de PVC (cloreto de polivinila). Esses grânulos são usados para construir um cartucho empacotado em uma bancada de laboratório comum. Esse dispositivo é capaz de digerir a proteína em solução, com um forte aumento dos desempenhos da reação de digestão. Em particular, comparado com o protocolo clássico de digestão de proteína mediante adição direta de tripsina na solução, ocorrem três melhorias principais obtidas através do uso do dispositivo funcionalizado:

- a) esse dispositivo não libera as moléculas de tripsina na solução;
- b) esse dispositivo reduz (ou até elimina) fragmentos de autólise de tripsina (ver as figuras 5 e 6);
- c) o tempo de digestão requerido para uma satisfatória análise de proteína através de espectrometria de massa é reduzido do período da noite do protocolo de digestão de

solução clássica para apenas alguns minutos (de 1 até 10 minutos, dependendo da concentração da proteína a ser digerida) (ver a figura 6).

5 Exemplo 11

Um biorreator é construído, de modo análogo ao descrito no Exemplo 10, em que diversos cartuchos de pó de PVC que se ligam a diferentes enzimas hidrolíticas hidrofobizadas são unidos em uma tubulação. Esse
10 dispositivo é de utilidade para purificar águas residuais de atividades industriais. As enzimas específicas usadas nas trocas de cartuchos dependem da composição da água residual a ser purificada; por exemplo, para purificar uma água residual de padaria, são usados os cartuchos ativados
15 com amilase e tripsina. Para purificar águas residuais de curtumes, são usados cartuchos ativados com lipase, colagenase e elastase.

Exemplo 12

20 Um biossensor é produzido, em que um disco de quartzo é coberto por uma superfície minúscula de ouro. Essa superfície foi hidrofobizada mediante cobertura da mesma com uma camada de tiocolésteróis, que reage espontaneamente com o ouro, produzindo uma camada ordenada.
25 Essa superfície hidrofobizada é adequada para o bloqueio de proteínas hidrofobizadas obtidas pelas duas estratégias propostas. O bloqueio da proteína pode ser medido mediante avaliação da quantidade do esvaziamento induzida pela massa

da proteína na frequência de oscilação espontânea de quartzo (ver um exemplo na figura 7). A proteína ativa bloqueada pode ser usada como sonda para qualquer interação específica de proteína-proteína. A ligação entre a sonda e
5 o fator específico para o reconhecimento pode ser lida como um adicional esvaziamento na oscilação do quartzo.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de preparação de uma proteína ativa hidrofóbica ou parcialmente hidrofóbica, compreendendo as etapas de reagir uma proteína ativa solúvel em água com um reagente capaz de converter um ou mais resíduos aminoácidos hidrofílicos em resíduos hidrofóbicos, **caracterizado** pelo fato de que o sítio ativo responsável pela atividade da proteína é protegido mediante operação da reação de hidrofobização em uma mistura homogênea de solventes de diferentes polaridades.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de compreender as seguintes etapas:

- dissolver a proteína ativa solúvel em água em uma solução aquosa;
- dissolver o reagente em um solvente de menor polaridade, pelo menos parcialmente miscível em água;
- preparar uma mistura homogênea polar/menos polar;
- reagir a proteína com o reagente; e
- recuperar a proteína ativa hidrofobizada.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de compreender ainda a dissolução na solução aquosa de um ligando reversível específico para o sítio ativo da proteína.

4. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que o reagente capaz de transformar resíduos aminoácidos hidrofílicos em resíduos hidrofóbicos é selecionado do

grupo que consiste de compostos de alquilação, acilação, arilação, compostos diazo, compostos formadores de ligação de peptídeo, formadores de base de Schiff ou compostos capazes de introduzir uma porção hidrofóbica.

5 5. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que a proteína ativa solúvel em água é selecionada do grupo que consiste de enzimas, hormônios, receptores, antígenos, anticorpos, alérgenos, proteínas imunorreativas, parceiros
10 de afinidade e quaisquer derivados, e fragmentos e complexos funcionalmente equivalentes dos mesmos.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que a proteína ativa solúvel em água é selecionada do grupo que consiste de aldolase de
15 músculos, tripsina, amilase, lipase, collagenase ou elastase.

7. Proteína ativa hidrofobizada, a qual pode ser obtida pelo método de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 6, **caracterizada** pelo fato de que possui
20 em uma parte da proteína mais distante ou oposta à região responsável pela atividade, um ou mais resíduos aminoácidos hidrofílicos convertidos em resíduos hidrofóbicos.

8. Proteína ativa hidrofobizada, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** pelo fato de apresentar um
25 ou mais resíduos aminoácidos hidrofílicos convertidos em resíduos aminoácidos de colesteril.

9. Método de preparação de um dispositivo consistindo de uma camada monomolecular de proteína ativa

orientada, imobilizada sobre um suporte sólido, **caracterizado** pelo fato de compreender a etapa de contatar a proteína hidrofobizada conforme as reivindicações 7 ou 8 com um suporte sólido hidrofóbico.

5 10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que o suporte sólido hidrofóbico é formado de polímeros naturais ou sintéticos, materiais de carbono, silício, metal, resinas, todos, opcionalmente derivatizados, de modo a torná-los hidrofóbicos.

10 11. Método, de acordo com as reivindicações 9 ou 10, **caracterizado** pelo fato de que o suporte sólido hidrofóbico se apresenta na forma de folheados, placas, lâminas, folhas, tubos, fibras, partículas, granulados e pós.

15 12. Dispositivo, **caracterizado** pelo fato de poder ser obtido pelo método de acordo com quaisquer das reivindicações 9 a 11.

 13. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de se apresentar na forma de um
20 cartucho embalado em uma bancada de laboratório ou na forma de um filtro ou na forma de um suporte de microssistema.

 14. Biorreator ou biossensor, **caracterizado** pelo fato de compreender ou consistir do dispositivo de acordo com as reivindicações 12 ou 13.

25 15. Tecnologia para pesquisar a interação entre uma proteína solúvel em água e um ligando ou candidato a ligando, **caracterizada** pelo fato de compreender as etapas de:

- preparar um dispositivo de acordo com as reivindicações 12 ou 13;
 - contatar a proteína imobilizada com o ligando ou candidato a ligando; e
- 5 - formar a imagem da proteína e/ou de seu complexo mediante Microscopia de Força Atômica (AFM).

16. Tecnologia para pesquisar a conformação de um material de proteína solúvel em água, **caracterizada** pelo fato de compreender as etapas de:

- 10 - converter o material de proteína em um material aleatoriamente hidrofobizado;
- contatar o material hidrofobizado com um suporte sólido hidrofóbico, de modo a obter uma camada monomolecular de material de proteína orientada imobilizado aleatoriamente;
- 15 - formar a imagem do material mediante Microscopia de Força Atômica (AFM);
- reconstruir a imagem do material original mediante auxílio de computador.

17. Uso do dispositivo de acordo com a

20 reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o dito uso se destina à preparação de microssistemas para análise de diagnóstico, análise genética, análise imunológica ou para manipulação mecânica da proteína ou material genético.

18. Uso do dispositivo de acordo com a

25 reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que o dito uso se destina à preparação de biorreatores para o tratamento de líquidos ou gases.

19. Método de preparação de um dispositivo, o

qual consiste de uma camada monomolecular de proteína ativa orientada, imobilizada sobre um suporte sólido, compreendendo uma primeira etapa de preparar uma proteína ativa hidrofóbica ou parcialmente hidrofóbica mediante
5 reação de uma proteína ativa solúvel em água com um reagente capaz de converter um ou mais resíduos aminoácidos hidrofílicos em resíduos hidrofóbicos, **caracterizado** pelo fato de que o sítio ativo responsável pela atividade da proteína é protegido mediante operação da reação de
10 hidrofobização na fase heterogênea, e uma segunda etapa de contatar a proteína hidrofobizada assim obtida, com um suporte sólido hidrofóbico.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado** pelo fato de que a reação de hidrofobização
15 compreende as etapas de:

- imobilizar a proteína ativa solúvel em água através de seu sítio ativo sobre uma matriz de afinidade;
- reagir a proteína imobilizada com o reagente; e
- eluir a proteína ativa hidrofobizada da matriz.

20 21. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 19 ou 20, **caracterizado** pelo fato de que o reagente capaz de transformar os resíduos aminoácidos hidrofílicos em resíduos hidrofóbicos é selecionado do grupo que consiste de compostos de alquilação, acilação,
25 arilação, compostos diazo, compostos formadores de ligação de peptídeo, formadores de base de Schiff ou compostos capazes de introduzir uma porção hidrofóbica.

22. Método, de acordo com quaisquer das

reivindicações 19 a 21, **caracterizado** pelo fato de que a proteína ativa solúvel em água é selecionada do grupo que consiste de enzimas, hormônios, receptores, antígenos, anticorpos, alérgenos, proteínas imunorreativas, parceiros de afinidade e quaisquer derivados, e fragmentos, e complexos funcionalmente equivalentes dos mesmos.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado** pelo fato de que a proteína ativa solúvel em água é selecionada do grupo que consiste de aldolase de músculos, tripsina, amilase, lipase, collagenase ou elastase.

24. Método, de acordo com as reivindicações 19 a 23, **caracterizado** pelo fato de que o suporte sólido hidrofóbico é formado de polímeros naturais ou sintéticos, materiais de carbono, silício, metal, resinas, todos, opcionalmente derivatizados, de modo a torná-los hidrofóbicos.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado** pelo fato de que o suporte sólido hidrofóbico se apresenta na forma de folheados, placas, lâminas, folhas, tubos, fibras, partículas, granulados e pós.

26. Dispositivo, **caracterizado** pelo fato de poder ser obtido pelo método de acordo com quaisquer das reivindicações 19 a 25.

27. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado** pelo fato de se apresentar na forma de um cartucho embalado em uma bancada de laboratório ou na forma de um filtro ou na forma de um suporte de microsistema.

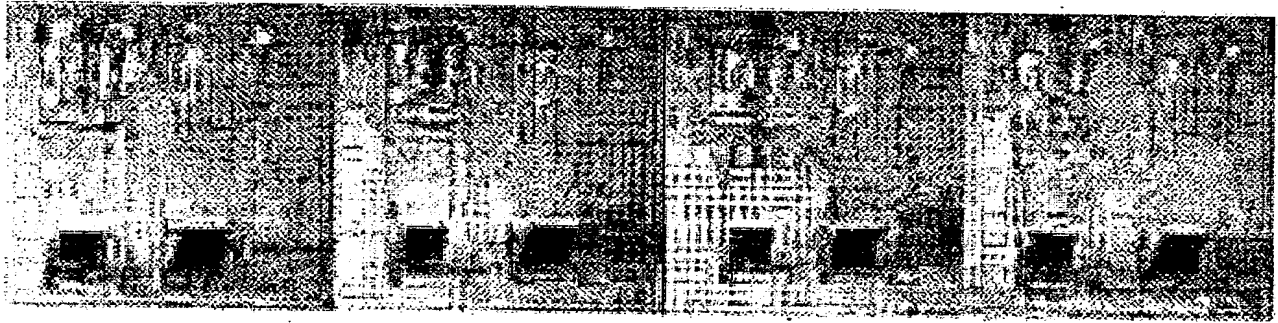


Figura 1

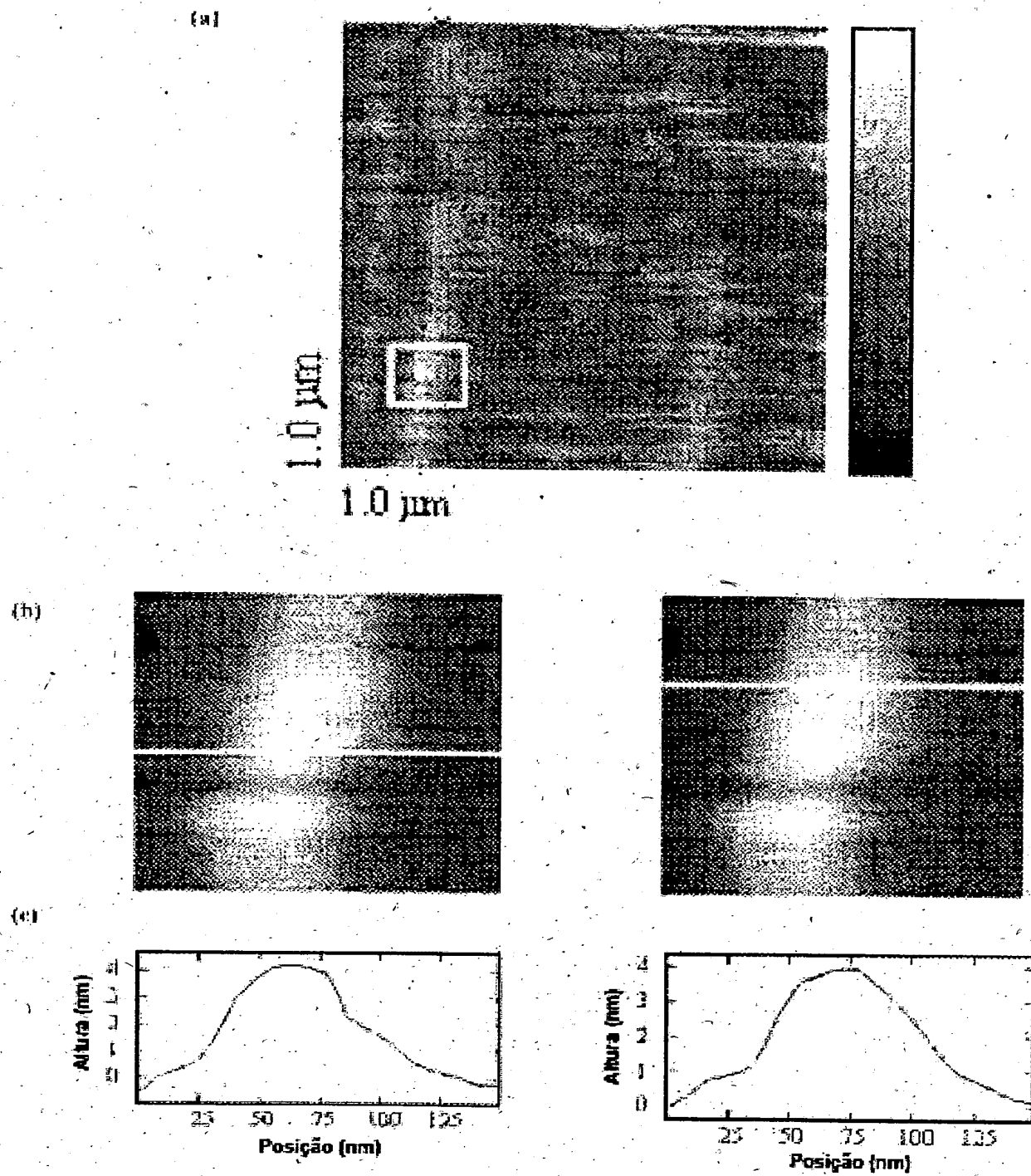


Figura 2

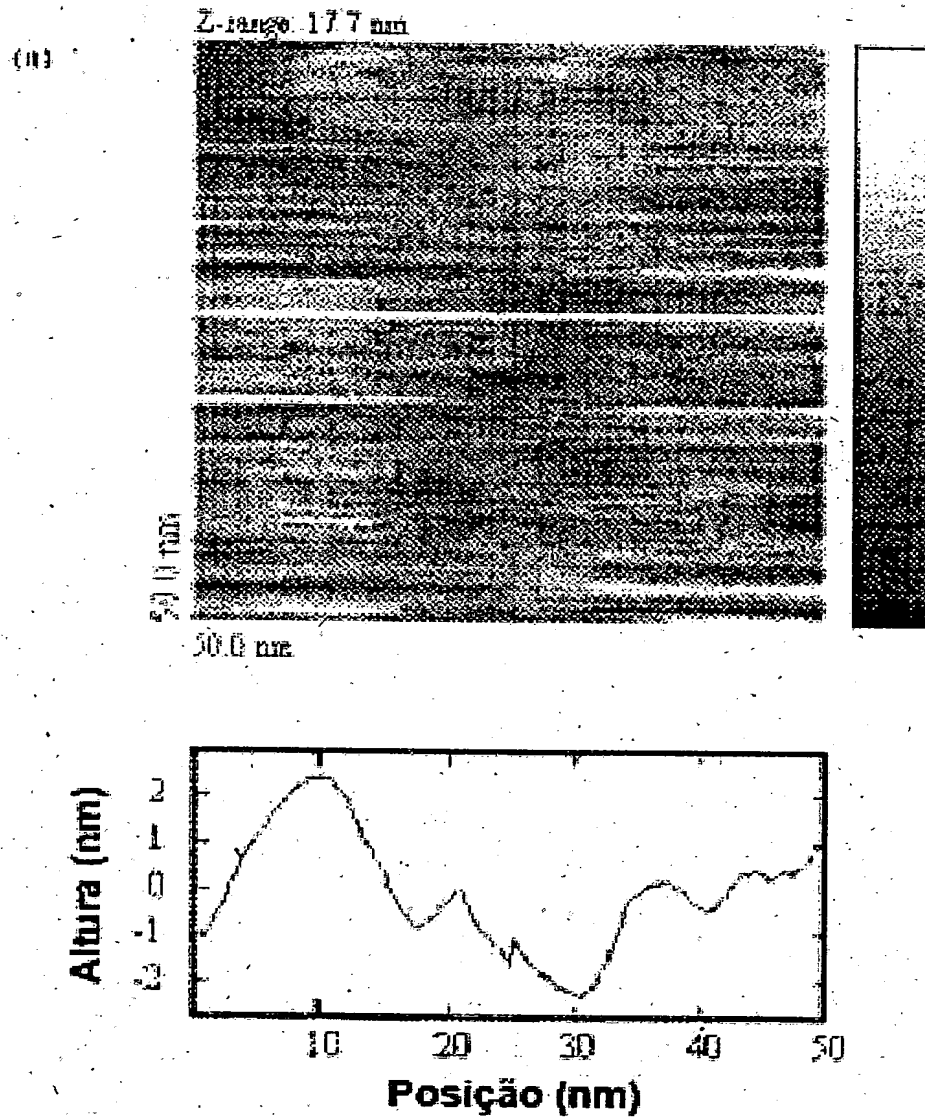
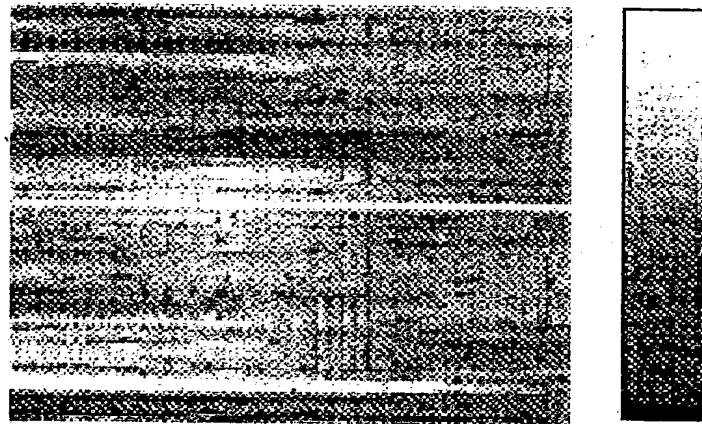


Figura 3

(a)



24.0 nm

(b)

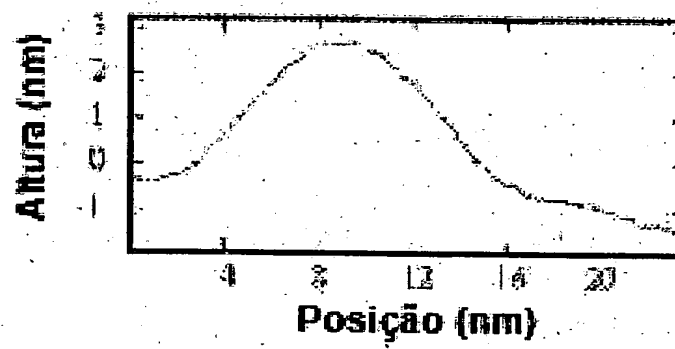
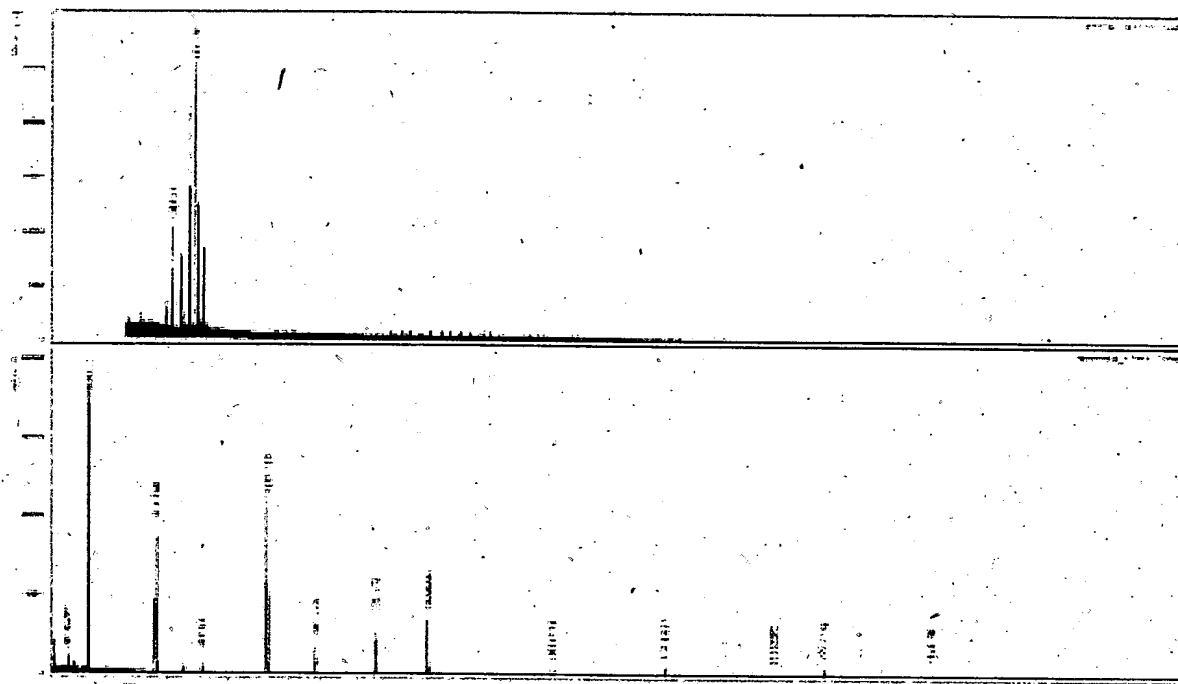


Figura 4

**Figura 5**

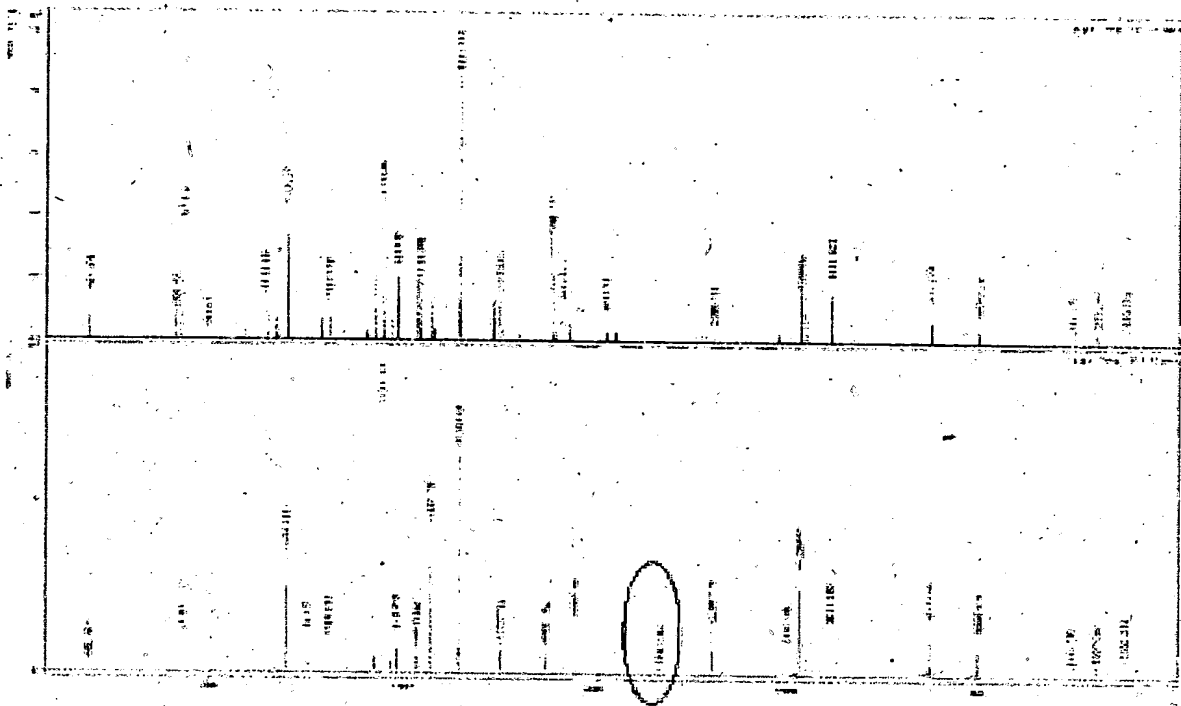


Figura 6

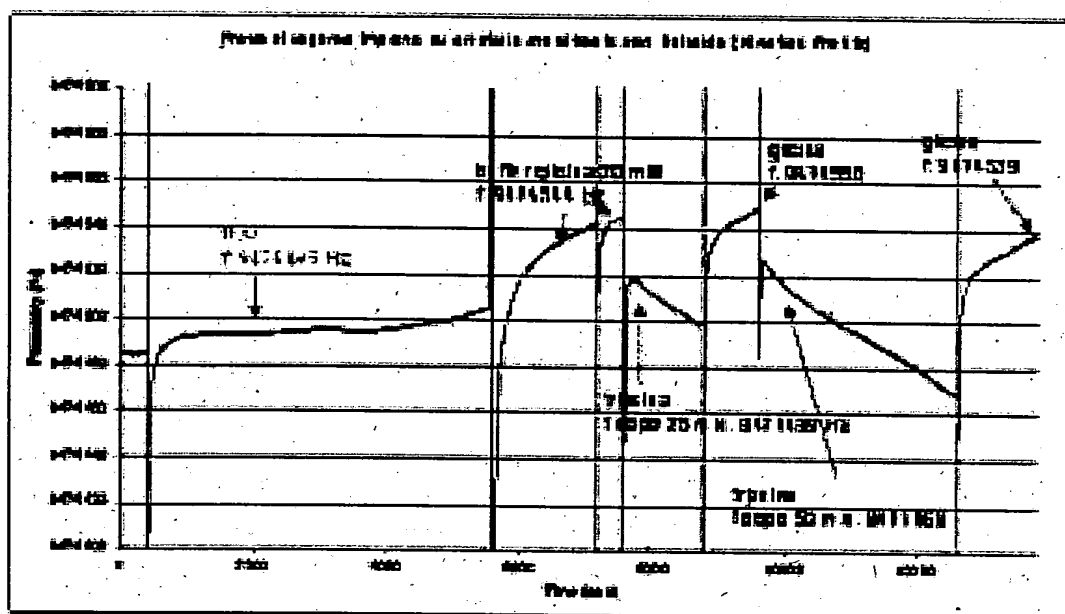


Figura 7

RESUMO

"MÉTODO DE CONVERSÃO DE PROTEÍNAS ATIVAS SOLÚVEIS EM ÁGUA
EM PROTEÍNAS ATIVAS HIDROFÓBICAS, USO DAS MESMAS PARA A
PREPARAÇÃO DE CAMADAS MONOMOLECULARES DE PROTEÍNAS ATIVAS
5 ORIENTADAS E DISPOSITIVOS COMPREENDENDO AS DITAS PROTEÍNAS"

A presente invenção se refere a um método para
converter proteínas ativas hidrofílicas (HPiAP) em
proteínas ativas hidrofóbicas (HPoAP), adequadas para a
10 fixação na sua forma ativa sobre substratos hidrofóbicos. A
presente invenção também se refere à preparação de camadas
ordenadas monomoleculares de proteínas ativas orientadas,
imobilizadas sobre suportes sólidos hidrofóbicos, a serem
usados na manipulação mecânica e em pesquisas, incluindo
15 Microscopia de Força Atômica (AFM) em soluções aquosas e
ensaios que utilizam os mesmos dispositivos.