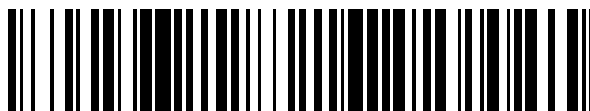


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 025**

51 Int. Cl.:

C12N 11/04 (2006.01)
C12N 11/14 (2006.01)
B01J 13/14 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
B82Y 30/00 (2011.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2014 PCT/EP2014/066365**
87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2015 WO15014888**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2014 E 14748154 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 3027750**

54 Título: **Composición biocatalítica**

30 Prioridad:

30.07.2013 EP 13178504

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2019

73 Titular/es:

**INOFEA AG (100.0%)
Hochbergerstrasse 60 c
4057 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**SHAHGALDIAN, PATRICK;
CORRERO-SHAHGALDIAN, MARIA RITA;
CUMBO, ALESSANDRO y
CORVINI, PHILIPPE FRANCOIS-XAVIER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 735 025 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición biocatalítica

La presente invención se refiere a la protección de proteínas y compuestos de tipo proteína. Más particularmente, la presente invención se refiere a métodos y composiciones que permiten proteger proteínas y compuestos de tipo proteína, p. ej. en condiciones adversas.

Las proteínas y los compuestos de tipo proteína, tal como las enzimas, se necesitan con frecuencia, p. ej. en aplicaciones industriales, diagnósticos para uso terapéutico, etc.

En estas aplicaciones, no se puede garantizar que las condiciones en las cuales, p. ej. se va a utilizar una enzima, serán aquellas donde la actividad de la enzima estará en un máximo. Más bien, se ha de esperar que las condiciones reales se desvíen significativamente de las condiciones óptimas, p. ej. con respecto a la temperatura, la presencia de contaminantes, los disolventes y así sucesivamente. De este modo, con frecuencia, las proteínas y compuestos de tipo proteína están sometidos a estrés real en uso o antes del uso, p. ej. durante el almacenamiento. Esto puede afectar negativamente su actividad o uso, en particular porque las proteínas o compuestos de tipo proteína con frecuencia son costosos y, por tanto, la pérdida de material activo o actividad puede causar un aumento significativo en los costos.

Se ha sugerido anteriormente inmovilizar enzimas sobre la superficie de un portador y protegerlas con una capa de material protector para generar una composición biocatalítica con resistencia aumentada a diversos tipos de estrés.

A este respecto, se ha mencionado que el uso de enzimas inmovilizadas en aplicaciones industriales garantiza su eliminación y, en consecuencia, simplifica el diseño del reactor y el control de la reacción (C. Mateo et al.). Se ha desarrollado un gran número de métodos de inmovilización y protección de enzimas (D. Brady y J. Jordaan). Esos métodos presentan ventajas tales como la posible reutilización de la enzima inmovilizada, protección de la enzima de estrés mecánicos (burbujas), químicos (cambios de pH, agentes caotrópicos) y biológicos (proteasas), pero también desventajas como pérdida de enzimas del soporte, pérdida de la estructura terciaria/activa de la proteína, restricción de la difusión del sustrato (R.C. Rodrigues et al.) y en el caso de material poroso (p. ej., sephabeads) obstrucción del portador. Además, para permitir el anclaje de la enzima al soporte, la enzima se modifica a veces genéticamente (HR Luckariff et al.).

Hanefeld et al., publicaron una revisión sobre la comprensión de la inmovilización enzimática. Este trabajo se centra en la importancia de las características de la enzima (p. ej., tamaño, estabilidad, necesidad de aditivos) y del portador (estabilidad química y mecánica, porosidad), así como de factores de reacción tales como las limitaciones de la difusión y la inhibición de la enzima, por nombrar solo algunos (U. Hanefeld et al.).

Hartmann y Jung describieron cómo la inmovilización de enzimas sobre soportes mesoporosos mejora su estabilidad operativa y permite su reutilización para procesos continuos. Hilterhaus et al., describieron sobre la inmovilización de varias enzimas (endoglucanasa, descarboxilasa y lipasa) sobre soportes Sephabeads y sobre el beneficio del uso repetitivo en un reactor de columna de burbujas, así como en un reactor de tanque agitado.

En 2005, Naik et al., presentaron una solicitud de patente para un método de inmovilización enzimática mediante biosilicificación. Los autores describieron que la inmovilización se produjo mezclando la enzima, el precursor de sílice y el péptido silafina; el material resultante mantuvo la actividad enzimática con estabilidad temporal mejorada.

Recientemente, Werchant presentó una patente para un método que describe la preparación de enzimas inmovilizadas. El sistema consiste en una red compuesta de enzima, polímero y agente reticulante. El sistema enzimático inmovilizado covalentemente conservó la actividad estable cuando se secó y almacenó en condiciones ambientales (S.A. Werchant).

El documento de EE.UU. No. 20120149082 A1 describe la síntesis de agregados de enzima-sílice reticulados; en particular para la inmovilización de lacasa, lipasa, proteasa, esterasa, oxinitrilasa, nitrilasa, aminoacilasa, penicilina acilasa, liasa, oxidasa y reductasa. El complejo se prepara recogiendo la enzima en un disolvente, precipitando la enzima y añadiendo un alcoxisilano y un agente de reticulación como el glutaraldehído.

Ostaszewski presentó una patente para un método relacionado con la inmovilización de la enzima levostatina esterasa en un gel de sílice aminopropil-silanizado activado por cloruro cianúrico.

El documento de EE.UU. 7642077 B2 describe otro método para la inmovilización de enzimas o células por coprecipitación con sílice y/o disolución de organosilicato a través de la acción de una molécula plantilla orgánica, a saber, una poliamina o un polipéptido.

Chung et al., presentaron una patente para un ensayo inmunoabsorbente unido a una cascada enzimática utilizando micropartículas magnéticas y nanopartículas magnéticas de sílice funcionalizadas con tosilo para la inmovilización del antígeno diana y el anticuerpo secundario específico del antígeno, respectivamente (S.J. Chung et al.).

El uso de la proteína marcada con histidina inmovilizada en sílice mesoporosa se ha presentado en el documento de EE.UU. 2010/0264188A1. La sílice mesoporosa primero se hace magnética por adsorción de Fe, y luego se recubre con Ni para permitir la inmovilización de una proteína/enzima específica marcada con histidina.

5 Auger et al., describieron un método para la incorporación de macromoléculas biológicas (al menos una proteína o ácido nucleico) dentro de nanopartículas porosas de sílice (30-40 nm) funcionalizadas por grupos que establecen enlaces iónicos y/o de hidrógeno no covalentes con la molécula diana (J.H. Chang et al., A. Auger et al.).

10 El documento WO 2011060129 A1 describe un método para inmovilizar y proteger covalentemente las enzimas en una corteza de polímero térmicamente sensible. El injerto covalente (p. ej., la unión del grupo vinilo) de la enzima permite la inmovilización covalente de la proteína al polímero. La corteza de polímero comprende al menos un polímero termosensible tal como poli(N-isopropilacrilamida), poli(isopropil-N-vinilpirrolidona) y/o N-isopropilacrilamida y/o polímero de poliestireno. La enzima encapsulada es estable a una temperatura superior a 30°C y se puede utilizar para la remediación química, administración de fármacos, curación de heridas y la terapia de proteínas (A. Auger et al.).

15 Recientemente, Lant presentó una patente para un método de tratamiento textil con una disolución acuosa que contiene partículas protegidas que contiene esterasa lipídica. En más detalle, el núcleo de las partículas protegidas comprende la enzima y el sustrato y está rodeado por capas de revestimiento de liberación retardada (que contienen polietilenglicol, alcohol polivinílico o hidroxipropilmetil celulosa) que también pueden contener el sustrato (N.J. Lant et al.).

20 Además de la protección de enzimas, han adquirido una gran importancia muchas aplicaciones importantes de proteínas de anclaje sobre soportes que incluye la fabricación de microarrays de proteínas funcionales y biosensores. (L.S. Wong et al.).

25 El documento WO 2012/142625 A2 describe un método para la fabricación de un "dispositivo de nanopartículas" que se puede utilizar para la administración de sustancias en el tejido diana vivo, preferiblemente tejido tumoral. Un dispositivo de nanopartículas incluye una estructura de corteza hecha por una capa interna y una externa. La capa interna contiene la sustancia administrable y tiene orificios; la capa externa, que está hecha de un material poroso, sella los orificios. En condiciones controladas, la capa externa se degrada y permite la administración de la sustancia contenida en el dispositivo de nanopartículas (L.S. Wong et al.).

La β -galactosidasa es una enzima (hidrolasa) que cataliza la reacción de hidrólisis de los β -galactósidos en monosacáridos. Por ejemplo, permite la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa.

30 Debido a su enorme importancia en la industria láctea, la inmovilización de la β -galactosidasa se ha investigado ampliamente y se han desarrollado diferentes estrategias (S.C. Esener et al.).

Ya en 1981, se ha presentado una patente acerca de la inmovilización de la lactasa sobre soporte sólido por Sumitomo Chemical Company (EP 0026672 A2). Este documento describe un método para inmovilizar lactasa activa sobre una resina de intercambio iónico macroporosa anfotérica de tipo fenol-formaldehído (Q. Husain).

35 En 1998, Giacomini et al. describieron la inmovilización covalente de la β -galactosidasa de la *K. lactis* sobre dos soportes porosos diferentes: un portador inorgánico recubierto con silano (sílice CPC) y agarosa (C. Giacomini et al.). La sílice CPC se activó con glutaraldehído, mientras que la agarosa se activó a través de un agente de cianilación. Aunque se inmovilizaron cantidades mayores de β -galactosidasa sobre la sílice CPC activado comparado con el otro soporte, solo se expresó el 34% de la actividad enzimática. Los autores explican este resultado como la inactivación de la enzima presente durante la inmovilización.

40 Más tarde, Tanriseven y Dogan mostraron que la β -galactosidasa del *Aspergillus oryzae* inmovilizada sobre alginato y fibras de gelatina, endurecidas con glutaraldehído, mantenía el 56% de su actividad inicial.

45 Mammarella y Rubiolo informaron sobre el atrapamiento de β -galactosidasa de la *Kluyveromyces fragilis* en perlas de geles de alginato-carragenina. La presencia de carragenano tuvo una influencia favorable en la reacción catalizada por enzimas porque el gel se formó en los iones K^+ , lo que aumenta la actividad de la enzima. Sin embargo, se observó una pérdida de enzima bastante relevante del soporte durante las reacciones continuas.

50 Los portadores hidrófilos tales como celulosa, agarosa, quitosán, dextrano, alginato, gelatina y colágeno se han utilizado como soporte de enzimas inmovilizadas con retención de actividad significativa (E.J. Mammarella y A.C. Rubiolo, S. Rejikumar y S. Devi). Sin embargo, estos materiales no siempre son adecuados para aplicaciones de enzimas inmovilizadas, ya que se pueden hinchar y/o degradar en condiciones operativas o en presencia de organismos microbianos.

55 Los materiales poliméricos fibrosos reticulados con glutaraldehído también se han utilizado para la inmovilización enzimática, pero su uso se caracteriza por una baja eficiencia de inmovilización y una actividad enzimática pequeña. Para producir galacto-oligosacáridos (GOS), la β -galactosidasa del *Aspergillus oryzae* se inmovilizó covalentemente sobre tela de algodón modificada con cloruro de tosilo (N. Albayrak y S.T. Yang). Los autores describieron que la

enzima inmovilizada tiene una vida media de 50 días a 50°C y más de 1 año a 40°C. El procedimiento para preparar las fibras de algodón es tedioso e implica el uso de productos químicos orgánicos. Para superar esas desventajas, se desarrolló una nueva estrategia de modificación del algodón con polietilenimina (N. Albayrak y S.T. Yang). El principal inconveniente de esta técnica sigue siendo la dificultad de producción en gran escala.

5 Mateo et al. midieron la actividad de la β -galactosidasa de la *K. lactis* inmovilizada sobre diferentes soportes: una resina epoxi-boronato (Eupergit), glioxil-agarosa, glutaraldehído-agarosa y glutaraldehído-Eupergit. En general, la actividad de la enzima inmovilizada fue 10% mayor que la de la enzima libre. Sin embargo, los soportes activados con epóxido presentaron la principal limitación de requerir una modificación superficial con grupos de adsorción que permiten que la enzima se adsorba sobre el soporte. Estas interacciones pueden alterar la estructura del catalizador y producir cambios en las características y el rendimiento de la enzima.

10 En el 2000 Ladero et al. describieron la hidrólisis de lactosa por una β -galactosidasa de la *K. fragilis* inmovilizada covalentemente sobre un soporte silanizado de sílice-alúmina comercial con APTES (3-aminopropiltrietoxisilano) y modificado con glutaraldehído. La enzima inmovilizada presentó una actividad catalítica 50% inferior a la de la enzima libre. Además, la actividad estaba limitada en un intervalo de temperatura entre 5°C y 40°C que puede no ser adecuado para el tratamiento de la leche.

15 Betancor et al. en 2007 describieron una nueva estrategia para crear una red tridimensional de nanoesferas de sílice que contenían β -galactosidasa atrapada de *E. coli* unida a un soporte de silicona. La β -galactosidasa inmovilizada fue estable y conservó más del 80% de su actividad inicial después de 10 días a 24°C. Incluso si tiene éxito, este enfoque presenta la principal desventaja de un procedimiento de preparación tedioso y la dificultad de producción en gran escala.

Una de las principales desventajas de la inmovilización enzimática en materiales de silicato es la baja porosidad del gel de sílice o del relleno de moléculas/enzimas en los canales de los mesoporos, resultando así en una actividad catalítica menor que la de las enzimas libres (Y. Kuwahara et al).

20 La β -galactosidasa del *A. oryzae* se atrapó en cápsulas de hidrogel de PVA (alcohol de polivinilo) con forma de lente (diámetro 3-4 mm, espesor 200-400 μ m) para la hidrólisis de la lactosa. La enzima conserva solo el 32% de su actividad original. Además, después de la inmovilización enzimática, se observó una disminución general de la afinidad de la β -galactosidasa por su sustrato. Los autores lo explicaron a través de los posibles cambios estructurales de la enzima después de la interacción con la matriz y la probable restricción de la difusión del sustrato a través del hidrogel (Z. Grosova et al.).

30 Neri et al. informaron sobre el atrapamiento de β -galactosidasa de la *K. lactis* en glutaraldehído activado con perlas magnéticas de un alcohol de polivinilo (PVA) y polisiloxano (POS). La enzima inmovilizada conservó aproximadamente la mitad de su actividad inicial después de ser reutilizada 20 veces. Sin embargo, la eficiencia catalítica de la enzima inmovilizada fue solo del 12% comparado con la encontrada para la enzima nativa. Esta actividad catalítica reducida se puede deber a cambios conformacionales de la enzima inducidos por el soporte, o a dificultades estéricas o difusión limitada del sustrato.

Aunque esos métodos son bastante interesantes y prometedores, su principal limitación consiste en la deficiencia de los sitios de anclaje de las enzimas, por lo tanto en la posible pérdida del catalizador del soporte, o en la disposición tridimensional no corregida de la enzima en su microentorno. Además, la mayoría de esos métodos tienen la desventaja de ser costosos, por lo tanto inadecuados para la producción a gran escala industrial.

40 El documento de EE.UU. 2010196985 A1 describe un método para unir covalentemente la lactasa a un soporte polimérico hidrofóbico funcionalizado, a saber, un material de envasado de alimentos (p. ej. poli(etileno), poli(etileno vinil acetato), poliestireno/copolímero de ácido acrílico). Aunque esta invención permite superar los inconvenientes generales de las técnicas de inmovilización enzimática, tales como la pérdida de catalizador, estabilidad del portador y el costo, tiene el límite principal de la reutilización de la enzima.

45 Además, del documento WO 2005/056808 A2, se conoce la inmovilización de biocatalizadores por precipitación de silicato dirigida por plantilla. El documento sugiere un biocompuesto donde se coprecipitan uno o más biocatalizadores y sílice u organosilicatos.

50 Del documento EP 2431742 A1, se conoce la preparación de un elemento de reconocimiento molecular. Se sugiere unir una plantilla a una superficie de material portador, para luego iniciar la polimerización del material de reconocimiento, detener la polimerización y liberar la plantilla del material de reconocimiento polimerizado. Se menciona que una polimerización preferida se puede basar en una policondensación de precursores de sílice, tal como el triacoxisilano y el tetraacoxisilano, en condiciones acuosas.

55 Del documento WO 93/07263, se conoce un gránulo que contiene enzima, que comprende un núcleo que tiene un material soluble o dispersable en agua recubierto con un polímero o copolímero de vinilo, una capa de enzima que comprende una o más enzimas y un polímero o copolímero de vinilo y un revestimiento exterior que comprende un polímero o copolímero de vinilo.

Del documento de EE. UU. 6,268,329B12, se conoce un gránulo que contiene enzima, en donde se proporciona un núcleo que contiene enzima que comprende un revestimiento con cantidades sustanciales de revestimientos solubles en agua. Se sugiere utilizar este gránulo en una composición detergente.

5 De S. BHATTACHARYYA et al., se conocen "nanopartículas mesoporosas de sílice recubiertas de polímero para la liberación controlada de macromoléculas". BHATTACHARYYA sugiere utilizar una nanoesfera mesoporosa de sílice preparada para la inmovilización del inhibidor de tripsina utilizada como una "proteína modelo" y luego unir covalentemente una capa delgada de PEG-amina a la superficie del portador cargado con inhibidor de tripsina, el PEG tiene un peso molecular de 3kDa y, por tanto, compuesto de aproximadamente 68 unidades de etilenglicol.

10 De Yong-Qing Xia et al. "Reconocimiento de proteínas sobre partículas de sílice que utilizan quitosano como sustrato intermedio", se conoce un método de impresión molecular para preparar partículas de sílice recubiertas dos veces con sitios de reconocimiento específicos para la hemoglobina. Se utilizó quitosano como un intermediario para recubrir las partículas de sílice mediante el proceso de inversión de fase, y la abundancia de grupos de aminas expuestas fueron sitios activos para la introducción de grupos aldehído. Después la hemoglobina se inmovilizó covalentemente formando enlaces imina con los grupos aldehído, luego la acrilamida se polimerizó sobre partículas de sílice recubiertas con
15 quitosano para formar los sitios de reconocimiento.

Según P. Galliker et al. "Las nanopartículas de sílice modificadas con lacasas catalizan eficientemente la transformación de compuestos fenólicos", se ha ensayado un sistema basado en nanopartículas de sílice modificadas con lacasas por su capacidad para degradar una sustancia química disruptora endocrina, el 4,4'-isopropilidendifenol (bisfenol A). Para esto, se han producido las nanopartículas utilizando el método Stoeber y se han caracterizado
20 utilizando microscopía electrónica de barrido, dispersión dinámica de la luz y mediciones de potencial. La introducción de grupos amino primarios en la superficie de estas partículas se ha efectuado utilizando un organosilano (amino-propil-trietoxisilano). El uso de glutaraldehído como agente de acoplamiento bifuncional ha permitido la conjugación de una lacasa del *Coriopsis polyzona* en la superficie de las nanopartículas, según se monitorizó midiendo la cantidad de proteínas acopladas y el potencial de las nanopartículas producidas. Se ensayó la actividad oxidativa del bio-conjugado así producido utilizando bisfenol A marcado radiactivamente. Se ha demostrado que incluso si se mide una
25 disminución de la actividad catalítica específica de la enzima inmovilizada, la actividad del bio-conjugado sigue siendo compatible con la aplicación de estos sistemas a la transformación de contaminantes fenólicos.

Según A.-M. Chiorcea-Paquim et al. "Estudio morfológico de la superficie en nanómetros por AFM de biosensores electroquímicos de glucosa oxidasa encapsulada con sol-gel de oxisilano mediador de redox neutral polimerizado in situ", se caracterizaron cuatro películas de sol-gel de sílice diferentes: metiltrimetoxisilano (MTMOS), tetraetoxisilano (TEOS), 3-aminopropiltriethoxisilano (APTOS) y 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GOPMOS) ensambladas sobre grafito
30 pirolítico altamente orientado (HOPG, en inglés highly oriented pyrolytic graphite) utilizando la microscopía de fuerza atómica (AFM, en inglés atomic force microscopy), debido a su uso en el desarrollo de biosensores de glucosa. Se mencionó que la estructura química del precursor de oxisilano y la composición de la mezcla sol-gel influyen en la rugosidad, el tamaño y la distribución de los poros en las películas de sol-gel, lo que es relevante para la encapsulación
35 de la enzima. Se menciona que la película sol-gel de GOPMOS cumple todas las características morfológicas requeridas para una buena encapsulación de la enzima, debido a una topografía suave con una distribución supuestamente muy densa y uniforme de solo poros pequeños en la superficie de 50 nm de diámetro. Se menciona que las películas de sol-gel de APTOS y MTMOS desarrollan poros pequeños junto con los grandes de 300-400 nm que permiten la pérdida de enzimas, mientras se describe que la película de TEOS forma una red rugosa e incompleta en el electrodo, menos adecuada para la inmovilización enzimática. Se mencionan los resultados de la AFM para explicar la variación de la estabilidad en el tiempo, la sensibilidad y el límite de detección obtenidos con diferentes biosensores de glucosa oxidasa encapsulada con sol-gel de oxisilano con mediador redox.

40 Por lo tanto, existe una necesidad no satisfecha de proporcionar un sistema económico y fácil de usar para proteger proteínas o compuestos de tipo proteína, particularmente enzimas, contra influencias desfavorables que pueden inactivar o desnaturalizar la proteína o enzima. Además, existe una necesidad especial de un sistema de protección, que permita el uso de la proteína o enzima en aplicaciones comerciales a gran escala y la reutilización de la proteína o enzima.

45 Esta necesidad se satisface dentro del alcance de la presente invención mediante el suministro de una composición y un método como se define por las características de las reivindicaciones independientes. Se describen en la presente memoria las realizaciones preferidas y/o están sometidas a las reivindicaciones dependientes.

50 Por tanto, lo que se sugiere es, entre otros, un método para producir una composición, la composición que comprende al menos un portador sólido, un constituyente funcional, seleccionado de una proteína y un compuesto de tipo proteína, y una capa protectora para proteger el constituyente funcional, mediante embebido del constituyente funcional al menos parcialmente, en donde el método comprende las etapas que primero el al menos un constituyente funcional se inmoviliza sobre la superficie del portador sólido y luego la capa protectora para proteger el constituyente funcional mediante embebido del constituyente funcional al menos parcialmente, está construida con bloques de construcción, al menos parte de los cuales son monómeros capaces de interactuar con ambos entre sí y con el constituyente funcional inmovilizado.

Este método permite una muy buena protección del constituyente funcional. Se cree que los buenos resultados que se pueden conseguir según la invención se deben a las siguientes razones. Los monómeros que forman la capa protectora serán capaces de interactuar con ambos entre sí y con el constituyente funcional; la interacción de los monómeros entre sí conduce a un autoensamblaje y, por tanto, a una reacción de construcción del polímero y así se crea un polímero alrededor del constituyente funcional, los monómeros están dispuestos cuidadosamente alrededor del constituyente funcional debido a la interacción adicional con el mismo. Se observará que la interacción de los monómeros entre sí no necesita ser el mismo tipo de interacción que la interacción de los monómeros con el constituyente funcional; tampoco es necesario que tales interacciones comiencen o se hagan visibles al mismo tiempo. Normalmente, los monómeros que forman la capa protectora interactuarán con el constituyente funcional antes de la interacción entre sí; la interacción entre sí normalmente será una reacción de los monómeros entre sí que conducirá a la formación de un polímero alrededor del constituyente funcional, mientras que al mismo tiempo, mientras que se forman los polímeros, los monómeros están (o permanecen) dispuestos cuidadosamente alrededor del constituyente funcional debido a la interacción adicional con el mismo. Dicha disposición estrecha de los bloques de construcción alrededor del constituyente funcional que se va a proteger no ocurrirá si se utilizan polímeros largos porque para estos, no se puede esperar que los grupos funcionales respectivos capaces de interactuar con el constituyente funcional, p. ej., a través de la unión no covalente estén en la posición correcta. Por tanto, la encapsulación según la invención será ajustada. Dado que la encapsulación es ajustada, el constituyente funcional se protegerá mejor, p. ej., porque la conformación del constituyente funcional se mantendrá mejor.

La imbibición será de tal manera que (al menos la gran mayoría o gran parte de) el constituyente funcional permanecerá embebido hasta su uso, preferiblemente hasta el final de su uso, y no se pretende que sea eliminado por lavado ni la eliminación por lavado tendrá lugar durante el uso previsto. Por tanto, la eliminación del constituyente funcional no se pretende y, de hecho, se debería evitar. Según la presente invención, mantener una mera impresión del constituyente funcional separado por lavado de una capa que sirve simplemente como una capa de reconocimiento que libera el material impreso no es pretendido ni suficiente. A diferencia de las capas de reconocimiento de liberación conocidas, la capa de protección de la presente invención se puede considerar, por consiguiente, una capa de protección de retención del constituyente funcional, que retiene dicho constituyente funcional durante el uso.

Una encapsulación ajustada ayuda en la retención. En este contexto, se debería observar que el término "ajustada", como se emplea en la presente memoria, no solo se puede utilizar para referirse a una relación espacial estrecha, sino que la actividad del constituyente funcional se puede utilizar como una medida de la estanqueidad, en particular la actividad del constituyente funcional después de un uso prolongado en ciertas condiciones.

Además, como la capa embebida se construye después de la inmovilización y, por tanto, después de que el constituyente funcional ya está sobre la superficie, no necesita haber material protector debajo del constituyente funcional. Esto está en marcado contraste con una coprecipitación, donde cantidades sustanciales de material protector estarán debajo del constituyente funcional y, por tanto, entre el constituyente funcional y el portador. Por consiguiente, la construcción de la capa protectora se puede controlar con mayor precisión y se obtiene más fácilmente una capa con propiedades específicas.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al método como se describe en la presente memoria para producir la composición según la presente invención, en donde el espesor del nanoentorno poroso se controla deteniendo la reacción de autoensamblaje del material protector a un momento específico para obtener una capa protectora con un espesor deseado.

Como el espesor de la capa puede ser una de las propiedades específicas controladas con mayor precisión, se puede evitar ocultando grandes cantidades de componentes funcionales (constituyentes) demasiado profundos dentro de la capa que se han alcanzado por las moléculas diana, haciendo por tanto un mejor uso de los constituyentes funcionales utilizados en la producción de la composición. Por consiguiente, el control sobre el espesor da la posibilidad de obtener una capa protectora final que tiene aproximadamente el tamaño del eje enzimático más grande. Tal capa será una capa homogénea donde toda la enzima presente en la capa protectora se activa de la misma manera.

Por consiguiente, el método según la invención se referirá preferiblemente a predefinir un tamaño objetivo para la capa protectora. Esta predefinición de un tamaño objetivo comprende la predefinición de un espesor objetivo, de modo que la polimerización del material protector sobre la superficie del material portador se detiene cuando el material protector polimerizado ha alcanzado un espesor que esencialmente es igual al espesor objetivo predefinido. Controlando el espesor del material protector polimerizado, el tamaño de la capa protectora que embebe la proteína o compuesto de tipo proteína inmovilizado en la superficie de un portador sólido se puede ajustar y optimizar convenientemente para una aplicación prevista.

En particular, controlando el espesor del material protector polimerizado, el crecimiento de la capa protectora se puede controlar y ajustar en un intervalo de 1 a 100 nm, 1nm a 50nm, 1nm a 30nm, 1nm a 25nm, 1nm a 20 nm, 1nm a 15nm, preferiblemente 5nm a 15nm. Dentro de estos intervalos, un nivel de precisión del crecimiento del material protector polimerizado puede estar en un intervalo de 1 a 10nm, de 1nm a 5nm, de 1nm a 4nm, de 1nm a 3nm, de 1nm a 2nm, preferiblemente 1nm. El espesor se puede comprobar utilizando un microscopio como el microscopio electrónico de barrido (SEM, en inglés scanning electron microscope), la microscopía electrónica de transmisión (TEM, en inglés transmission electron microscopy), la microscopía de sonda de barrido (SPM, en inglés scanning probe microscopy) o

los métodos de dispersión de la luz. Por ejemplo, como es conocido en la técnica, el SEM es un tipo de microscopio electrónico que capta la imagen de una superficie de una muestra escaneándola con un haz de electrones de alta energía en un patrón de exploración de trama. Los electrones interactúan con los átomos que forman la muestra produciendo señales que contienen información sobre la topografía de la superficie (p. ej., la topografía del material protector polimerizado), la composición y otras propiedades tal como la conductividad eléctrica. La forma de llevar a cabo tal tipo de microscopía para el objeto de análisis es bien conocida por el experto en la técnica.

Detener la polimerización del material protector sobre la superficie del material portador, cuando el espesor del material protector polimerizado es esencialmente igual que el espesor objetivo predefinido, permite un control preciso del tamaño de la capa protectora. En este contexto, también se puede determinar preliminarmente una cinética de crecimiento para el crecimiento de la capa protectora en términos de espesor del material protector a polimerizar de una manera dependiente del tiempo para las condiciones dadas. Los resultados de esta determinación se pueden utilizar después para detener la reacción de polimerización una vez que el material protector polimerizado haya alcanzado el espesor de la capa predefinido.

En un aspecto, la predefinición del espesor objetivo del material protector polimerizado comprende la predefinición de una duración objetivo para la reacción de polimerización en condiciones de reacción dadas. La polimerización del material protector sobre la superficie del material portador se realiza luego en estas condiciones y se detiene en el momento predefinido en el que se determinó que la polimerización del material protector sobre la superficie del material portador era esencialmente igual al espesor objetivo predefinido. El término "condiciones" en este contexto se refiere a los parámetros que determinan el crecimiento del material protector. En particular, se puede referir a la concentración (inicial) y la composición de los bloques de construcción monoméricos utilizados en el material protector, la temperatura de polimerización, la presión y/o la humedad. Se entenderá que donde se hace referencia a la "interacción de monómeros entre sí" y donde tal interacción es una reacción de polimerización, la interacción de monómeros también incluirá la interacción de monómeros con productos intermedios obtenidos durante la polimerización.

El procedimiento anterior permite controlar con precisión el espesor del material protector polimerizado y, por consiguiente, el espesor de la capa protectora, particularmente el espesor de la capa protectora alrededor de la proteína o compuesto de tipo proteína inmovilizado embebido en el material protector. Por ejemplo, controlando el espesor del material protector autoensamblado, la actividad de una enzima inmovilizada embebida en dicho material protector puede ser modulada selectivamente. En este contexto, una cinética de crecimiento del material protector polimerizado, que tiene en cuenta la duración de la polimerización del material protector que se va a polimerizar para condiciones dadas y la actividad de la enzima que depende del espesor del material protector autoensamblado, puede ser determinado preliminarmente. Como un resultado de esta determinación, la reacción de polimerización se puede detener una vez que se alcanza la actividad enzimática preferida, que depende del espesor de la capa. Por ejemplo, la polimerización se puede detener una vez que el equilibrio entre la actividad de la enzima y la resistencia de la enzima al estrés sea óptimo.

Se debería observar que, aunque que no es necesario utilizar una composición o mezcla de monómeros 100% pura libre de dímeros y oligómeros para el método de la presente invención, el porcentaje de monómeros utilizados como bloques de construcción debería ser, como regla general, muy alto para obtener buenos resultados. Donde más bloques de construcción están en forma de monómeros, es decir, donde un mayor porcentaje de los bloques de construcción está constituido por monómeros, se mejora la auto-ordenación y la organización fina y precisa de los monómeros alrededor de la enzima u otro constituyente funcional inmovilizado, dando como resultado una mayor probabilidad de que los rendimientos de protección resultantes de la capa embebida sean particularmente efectivos. Cuando se utilizan dímeros u oligómeros, la capa protectora final estaría enrollada menos firmemente alrededor de la enzima, por lo tanto, se deben esperar rendimientos de protección menos efectivos.

Sin embargo, los monómeros disponibles comercialmente normalmente serán suficientes para las necesidades de la presente invención. Se puede esperar que para estos más del 80% de los bloques de construcción estarán en forma de monómeros, y normalmente más del 95% de los bloques de construcción estarán en forma de monómeros.

Es ventajoso si los monómeros utilizados son capaces además de interactuar con la superficie del portador sólido, ya que esto asegurará que la capa protectora también se una al portador, evitando que la capa protectora no sea lo suficientemente ajustada.

Con frecuencia, antes de inmovilizar el constituyente funcional sobre la superficie del portador sólido, el portador sólido se modifica para mejorar la inmovilización del constituyente funcional sobre la superficie.

Así que, en una realización adicional, la presente invención se refiere a un método como se describe en la presente memoria para producir la composición según la presente invención, donde la superficie de dicho portador sólido como se describe en la presente memoria se modifica para introducir al menos una molécula como punto de anclaje. Dicha al menos una molécula utilizada como punto de anclaje se puede modificar además induciendo una reacción química de la al menos una molécula como punto de anclaje con un agente reticulante bifuncional. En particular, dicho punto de anclaje es un resto amina; más particularmente amino-silano, más particularmente 3-aminopropiltrióxosilano (APTES). La al menos una proteína o compuesto de tipo proteína de interés como se describe en la presente memoria y, opcionalmente, la al menos una molécula opcional como se describe en la presente memoria se acopla en la

- 5 superficie del portador modificado a través del grupo funcional activo libre del agente reticulante bifuncional. En particular, dicho agente reticulante bifuncional es glutaraldehído. Otros ejemplos de agentes reticulantes bifuncionales son el tartrato de disuccinimidilo, suberato de bis[sulfosuccinimidilo], etilenglicolbis(sulfosuccinimidilsuccinato), adipimidato de dimetilo, pimelimidato de dimetilo, aminobenzoato de sulfosuccinimidil(4-iodoacetilo), 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno, sulfhidrilos activados (p. ej., 2-piridilditio reactivo con sulfhidrilo).
- En una realización específica, la presente invención se refiere al método como se describe en la presente memoria para producir la composición según la presente invención, donde el grupo funcional activo libre del agente reticulante bifuncional es un aldehído, ácido carboxílico, imidoéster y/o un haluro de arilo.
- 10 En otra realización específica, la presente invención se refiere al método como se describe en la presente memoria para producir la composición según la presente invención, en donde la proteína o compuesto de tipo proteína como se describe en la presente memoria, particularmente la enzima o compuesto de tipo enzima, se une covalentemente en la superficie del portador sólido.
- 15 El método según la invención y como se describe en la presente memoria puede comprender así la etapa adicional de activar la superficie del material portador antes de unir la proteína o compuesto tipo de proteico a la superficie del material portador y en un aspecto específico, esto puede ser logrado distribuyendo homogéneamente un medio de enlace en la superficie del material portador.
- 20 En este contexto, la distribución homogénea de los medios de enlace se refiere a los medios de enlace que están unidos sobre la superficie del material portador mediante un espaciado igual o al menos comparable entre ellos. En particular esto se logra donde los constituyentes funcionales inmovilizados en la superficie del portador no se obstruirán o se interferirán de otro modo entre sí; preferiblemente, también queda espacio adecuado para unir monómeros a la superficie del portador. La homogeneidad de los sitios de unión presentados por medios de enlace puede depender de la homogeneidad de la superficie del material portador.
- Preferiblemente, los medios de enlace están distribuidos homogéneamente sobre la superficie del material portador debido al suministro de una superficie modelada del material portador.
- 25 La superficie modelada se puede obtener de diversas maneras tal como preparando una superficie compuesta de partículas, es decir, nanopartículas, en donde cada partícula tiene un diámetro predefinido. Además, se puede obtener una superficie modelada estructurando la superficie con áreas atrayentes y no atrayentes que se distribuyen homogéneamente sobre la superficie del material portador. Las áreas atrayentes, por ejemplo, tienen una afinidad con un medio de enlace. En cambio, las áreas no atrayentes tienen una afinidad reducida o nula por los medios de enlace y, por lo tanto, los medios de enlace no son capaces de unirse a la superficie del material portador. Dichas superficies estructuradas se pueden obtener mediante técnicas bien conocidas, p. ej., un enfoque fotolitográfico o impresión de microcontacto.
- 30 Así que, se observa que es posible que solo una parte del área superficial se modifique para mejorar la inmovilización del constituyente funcional, mientras que otras partes permanecen sin modificar y que, en tal caso, los monómeros son (también) preferiblemente capaces de unirse a la interacción con las partes no modificadas de la superficie del portador. De esta manera, la capa de protección será particularmente ajustada, ya que se une tanto al constituyente funcional como a la superficie del portador. Por consiguiente, se puede obtener una composición particularmente estable.
- 35 A este respecto, el experto en la técnica entenderá también que el tipo de química aplicada al portador, tal como la modificación amino, y más precisamente la densidad de los grupos amino modificadores, puede afectar la estabilidad y la actividad de la proteína en la etapa de inmovilización. Como un agente reticulante utilizado para la inmovilización (p. ej., glutaraldehído) generalmente está uniendo la proteína covalentemente al material de soporte, una alta densidad de grupos amino superficiales y, por lo tanto, una alta densidad de puntos de anclaje fijaría, estiraría, aplanaría y finalmente desplegaría la enzima, por lo tanto, lo más probable es que afecte a la estructura de la proteína, que por lo tanto perderá la función. En este contexto, se observa que, generalmente, el uso del agente reticulante de manera que las primeras partículas se modifiquen con el agente reticulante y luego la proteína añadida no afectará la estructura de la proteína o al menos afectará la estructura de la proteína menos que un enfoque diferente en donde se efectúa la primera adsorción de proteínas sobre las partículas y luego se añade el agente reticulante, que es más probable que de como resultado una estructura proteica alterada, ya que el exceso de agente reticulante puede "fijar" o "estirar" la proteína.
- 40 45 50 Por tanto, se debería alcanzar una densidad apropiada de grupos amino de anclaje en la superficie de las partículas para obtener una inmovilización estable. Muy pocos grupos amino de anclaje darán como resultado una pérdida de la proteína unida débilmente. Por el contrario, una densidad de grupos amino de anclaje demasiado alta puede dar como resultado un despliegue de la proteína inmovilizada.
- 55 Como se emplea en la presente memoria, el término "medios de enlace" se refiere, p. ej., a reactivos reticulantes o agentes reticulantes que contienen extremos reactivos, que son capaces de unirse a grupos funcionales específicos (p. ej., aminas primarias, sulfhidrilos, etc.) de tal manera que un extremo del reactivo de reticulación o agente reticulante se une a la superficie del material portador y el otro extremo a una proteína o compuesto de tipo proteína.

Los agentes reticulantes se pueden utilizar para modificar ácidos nucleicos, proteínas, polímeros y superficies sólidas o plantillas sólidas. Por ejemplo, un agente reticulante se puede inmovilizar sobre una superficie de sílice como un material portador y luego una proteína o compuesto de tipo proteína se puede unir a un sitio de unión desocupado del agente reticulante. Alternativamente, el agente reticulante se puede unir primero a la proteína o compuesto de tipo proteína y luego el agente reticulante unido a la proteína o compuesto de tipo proteína se puede unir con su sitio de unión desocupado a la superficie de sílice. El agente reticulante utilizado en el método según la presente invención puede depender del tipo de material portador a utilizar, tal como óxidos inorgánicos tales como óxidos de silicio u óxidos de titanio, compuestos orgánicos, inorgánicos, poliméricos o inorgánicos-orgánicos y material orgánico autoensamblado. Preferiblemente, el agente reticulante puede ser un agente reticulante escindible, es decir, un agente reticulante que sea capaz de tener su enlace escindido al recibir estímulos externos tales como temperatura, pH, electricidad, luz. En particular, se puede utilizar un agente reticulante tal como el DTSSP (3,3'-Ditiobis [sulfosuccinimidilpropionato]), que puede ser escindido, por ejemplo, mediante el uso de DTT (Ditiotreitól) como un agente reductor.

Como un ejemplo no limitante, se puede utilizar una superficie de sílice modificada con amino como un material portador modificado con un reticulante homobifuncional (p. ej., glutaraldehído) y formar una base de Schiff con el grupo amina en la superficie del material portador. Luego, el grupo aldehído libre residual puede formar otra base de Schiff con la proteína o compuesto de tipo proteína y, por lo tanto, la proteína o compuesto de tipo proteína se puede unir a la superficie del material portador. Se debería tener cuidado, ya que la proteína o el compuesto de tipo proteína podrían liberarse en condiciones ácidas.

Si se utiliza una superficie de oro o titanio como un material portador, un agente reticulante adecuado para unir la plantilla a la superficie respectiva puede tener un grupo externo de tiol que hace posible la unión a la superficie respectiva y además un enlace disulfuro intramolecular escindible.

Se prefiere si el constituyente funcional, es decir, la proteína o compuesto de tipo proteína está unido a la superficie del material portador mediante unión covalente. Como esto significa que la superficie del portador es capaz de la unión covalente, los monómeros también pueden adaptarse para interactuar con la superficie modificada a través de dicho enlace. En general, se prefiere si los monómeros se unen directamente a esta superficie, y es posible preparar la superficie para mejorar la inmovilización.

Por tanto, la composición puede comprender además al menos un agente reticulante bifuncional para unir el al menos un constituyente funcional, seleccionado de una proteína y un compuesto de tipo proteína a la superficie del portador sólido, particularmente un agente reticulante para el reticulado de amina en funciones de sulfhidrilo (tiol) y/o un agente reticulante para el reticulado de sulfhidrilo en funciones de sulfhidrilo (tiol) y/o un agente reticulante bifuncional seleccionado del grupo de glutaraldehído, tartrato de disuccinimidilo, suberato de bis[sulfosuccinimidilo], etilenglicolbis(sulfosuccinimidilsuccinato), adipimidato de dimetilo, pimelimidato de dimetilo, aminobenzoato de sulfosuccinimidil(4-iodoacetilo), 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno, sulfhidrilos activados, 2-piridilditio reactivo con sulfhidrilo), BSOE (Bis[2-(succinimidooxicarbonilo)etil]sulfona), DSP (Ditiobis[succinimidilpropionato]), DTSSP (3,3'-Ditiobis[sulfosuccinimidilpropionato]), DTBP (3,3'-ditiobispropionimidato de dimetilo 2 HCl), DST (Disuccinimidil tartrato), Sulfo-LC-PT (4-Sulfosuccinimidil-6-[α -metil- α -(2-piridilditio)toluamido]hexanoato), SPDP (3-(2-piridilditio)-propionato de N-succinimidilo), LC-SPDP (6-(3-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato de succinimidilo), SMPT (4-succinimidiloxicarbonil- α -metil- α -[2-piridilditio]tolueno), DPDPB (1,4-Di-[3'-(2'-piridilditio)-propionamido]butano), DTME (ditio-bismaleimidoetano), BMDB (1,4 bismaleimidil-2,3-dihidroxi-butano).

No es necesario que el constituyente funcional esté inmovilizado sobre la superficie del portador en una orientación particular. Más bien, incluso se puede obtener un buen efecto protector según la invención si la orientación de las moléculas del constituyente funcional inmovilizado sobre la superficie del portador es aleatoria. Esto se puede deber al hecho de que para la mayoría de los constituyentes funcionales existe una pluralidad de sitios de interacción con monómeros en cada orientación, de modo que, independiente de la orientación específica de una molécula dada, dará como resultado una unión ajustada de la capa protectora.

Además, mientras el sustrato será capaz de penetrar en la capa protectora y/o alcanzar el sitio activo de la enzima u otro constituyente funcional, la orientación de la enzima inmovilizada sobre la superficie del portador no es vital para ser considerada. Ahora, como la capa protectora se puede diseñar para ser bastante delgada y, de este modo se puede diseñar para que sea fácilmente penetrable por la molécula diana que debe interactuar con el constituyente funcional inmovilizado y protegido, la capa protectora apenas afectará negativamente la actividad independientemente de la orientación de la enzima del constituyente funcional. No obstante, en la mayoría de los casos, la capa de protección será lo suficientemente gruesa para retener el constituyente funcional de una manera bloqueada, proporcionando así polimerización, p. ej. el material policondensado construido a partir de los monómeros sobre al menos parte de las moléculas constituyentes funcionales, de tal manera que la liberación está perjudicada o evitada. Con constituyentes funcionales que tienen secciones transversales moleculares circulares, este es obviamente el caso donde la capa de protección es más gruesa que el 50% del diámetro de la sección transversal. En tal caso, donde se produce el bloqueo, las moléculas no solo se mantienen por la interacción débil con los bloques de construcción, sino que también se mantendrán porque los bloques de construcción sobre las moléculas constituyentes funcionales se reticularán con otros bloques de construcción que forman el polímero y la eliminación de las moléculas constituyentes funcionales requerirían, de este modo, que se superen tales fuerzas de reticulación. Esto está en marcado contraste

con una capa de reconocimiento formada para liberar, p. ej., partículas virales en la tecnología de impronta de virus. El experto medio en la técnica se dará cuenta que proporcionar poros en la capa protectora es particularmente eficaz para permitir el uso de capas que alcancen o superen el 100% del diámetro de la sección transversal relevante de un constituyente funcional, incluso si la difusión de las moléculas de material diana que va a interactuar con el constituyente funcional a través de tales capas, de otro modo, es lento o imposible. Por tanto, proporcionar poros es útil para retener mejor los constituyentes funcionales. Por tanto, se prefiere particularmente una capa de retención de constituyente funcional porosa como capa protectora.

Por consiguiente, como no es necesario inmovilizar las moléculas del constituyente funcional en una orientación particular, es más fácil llevar a cabo el método según la presente invención.

Sin embargo, debería preferirse la orientación, dicha orientación se puede obtener aplicando una disolución específica a la enzima, por ejemplo, inmovilizando la enzima en presencia de un sustrato específico o en presencia de disolvente, o utilizando una estrategia de inmovilización específica como se conoce per se en la técnica. .

Además, no es necesario añadir solo los constituyentes funcionales a la composición. En cambio, es posible que la composición comprenda además al menos una clase de molécula funcional (auxiliar) seleccionada de los grupos de moléculas adaptadoras, moléculas de anclaje, moléculas de andamiaje y/o moléculas receptoras. Por lo tanto, la presente invención se refiere además, en una realización particular, a una composición de la invención como se describe en la presente memoria, en donde dicha composición comprende además opcionalmente al menos una molécula seleccionada de los grupos de moléculas adaptadoras, moléculas de anclaje, moléculas de andamiaje y/o moléculas receptoras. Cualquiera de estas moléculas se puede utilizar para unir, estabilizar, capturar, atrapar o captar una molécula de sustrato (diana). Esto permite llevar el sustrato o la pareja de interacción más próxima al constituyente funcional, es decir, la proteína o compuesto de tipo proteína, particularmente la enzima o compuesto de tipo enzima, y facilitar así la interacción de la proteína o compuesto de tipo proteína y su sustrato o pareja de interacción.

Por consiguiente, el uso de tales moléculas funcionales (auxiliares) puede ayudar a inmovilizar el constituyente funcional y/o a estabilizar el constituyente funcional una vez inmovilizado o antes de la construcción de la capa protectora. En caso de que se utilicen tales moléculas funcionales (auxiliares), será ventajoso si los bloques de construcción monoméricos se seleccionan de manera que sean capaces además de interactuar con al menos una clase de moléculas funcionales seleccionadas de los grupos de moléculas adaptadoras, moléculas de anclaje, moléculas de andamiaje y/o moléculas receptoras, de modo que la capa protectora para proteger el constituyente funcional también embebe el al menos un tipo de moléculas funcionales.

En una realización preferida particular, la capa protectora construida según la invención será una capa porosa.

En este contexto, será obvio para el experto en la técnica que para hacer uso del constituyente funcional, se debe acceder a las áreas específicas del mismo mediante las moléculas específicas o grupos de moléculas con los que se va a utilizar la composición de la presente invención. Ahora, tales moléculas "diana" pueden tener acceso directo o a un sitio específico del constituyente funcional en caso de que el constituyente funcional esté solo parcialmente embebido y el área específica respectiva no esté cubierta o, de otro modo, el acceso debe efectuarse a través de la capa protectora. En ese caso, se necesitan proporcionar poros que den acceso a las moléculas "diana" a los sitios específicos del constituyente funcional inmovilizado y protegido.

A partir de lo anterior, es obvio que la presente invención se puede expresar para tal caso y una realización particular no limitante que se refiere a un método para producir una composición que comprende las etapas de obtener un portador sólido; e inmovilizar al menos una proteína o compuesto de tipo proteína de interés, particularmente al menos una enzima o compuesto de tipo enzima (y, como será obvio a partir de la presente descripción) opcionalmente, al menos una molécula opcional en la superficie del portador; y luego incubar la al menos una proteína o compuesto de tipo proteína y, si corresponde, la molécula opcional unida a la superficie del portador sólido con bloques de construcción autoensamblables para producir un nanoentorno poroso alrededor de la superficie libre del portador sólido y la al menos una proteína y/o compuesto de tipo proteína y la molécula opcional unida a la superficie del portador sólido.

Como se ha mencionado anteriormente, la construcción de la capa protectora se puede controlar con precisión y se puede obtener fácilmente una capa con propiedades específicas. En particular, se ha mencionado anteriormente que el espesor de la capa se puede controlar con precisión.

Se puede esperar que en la mayoría de los casos, la protección será mejor si la capa es lo suficientemente gruesa para garantizar una protección suficiente contra las influencias adversas, mientras que una capa demasiado gruesa podría perjudicar la actividad. Tal deterioro será causado porque donde se proporcionan poros insuficientes en una capa demasiado gruesa, se evita el acceso de las moléculas diana al constituyente funcional inmovilizado y protegido, mientras que en el caso donde se proporcionen poros particularmente grandes y/o numerosos, la protección podría verse perjudicada ya que la capa no encapsulará suficientemente el constituyente funcional. Por lo tanto, se puede esperar que existirá un espesor óptimo para la capa protectora.

Es ventajoso si el espesor de la capa protectora es al menos el 5% de la longitud del eje más largo de el al menos un constituyente funcional, preferiblemente entre 50% y 150% de la longitud del eje más largo de el al menos un

constituyente funcional. En un caso típico, el espesor de la capa protectora oscila de 1 a 100 nm, más típico de 1 nm a 50 nm, más típico de 1 nm a 30 nm, más típico de 1 nm a 25 nm, más típico de 1 nm a 20 nm, más típico de 1 nm a 15 nm, preferiblemente de 5 nm a 15 nm. Se entenderá que el espesor óptimo de la capa puede variar con el constituyente funcional específico considerado, con la molécula diana específica e incluso con el parámetro del proceso con el que se vaya a utilizar probablemente la composición. También se entenderá que dicho espesor óptimo se puede determinar con una serie simple de mediciones que comparan las actividades obtenidas con diferentes espesores de la capa protectora en condiciones de otro modo idénticas. Por tanto, es posible la adaptación a las condiciones específicas del proceso. De nuevo, se puede observar que un valor preferido del espesor se puede determinar experimentalmente. Por tanto, se entenderá que, en ciertos casos, el material protector como el proporcionado por la composición de la invención y como se describe en la presente memoria, puede adaptarse a las necesidades específicas y puede tener un espesor de entre 2 nm y 50 nm, particularmente entre 5 nm y 40 nm, particularmente entre 5 nm y 25 nm, particularmente entre 10 nm y 25 nm, particularmente entre 5 nm y 20 nm, particularmente entre 10 nm y 20 nm, particularmente entre 15 nm y 25 nm, particularmente entre 15 nm y 20 nm, particularmente entre 20 nm y 25 nm o más de 25 nm.

También se debería observar que, en caso de necesidad de determinar tanto el espesor de la capa protectora como el tamaño de poro específico, esto se puede hacer de forma repetitiva, p. ej., determinando primero un espesor de capa óptimo con un tamaño de poro que corresponda al menos al tamaño de la molécula diana en una primera serie de experimentos, para luego reajustar el tamaño de poro para una actividad óptima con el espesor de capa encontrado anteriormente y, si es necesario, reajustar el espesor de capa para una actividad óptima con el tamaño de poro mejorado. Se encontrará que se obtendrá una buena actividad en pocas etapas repetitivas.

Dado lo anterior, será obvio que los poros en la capa protectora serán particularmente ventajosos si la capa protectora es al menos el 50% de la longitud del eje más largo de la molécula constituyente funcional. En este contexto, se puede suponer que la inmovilización del constituyente funcional se efectúa en una orientación aleatoria. Si las moléculas del constituyente funcional se inmovilizan de manera orientada, p. ej., con el eje más largo generalmente paralelo a la superficie del portador, y la relación de aspecto de los ejes largo y corto de las moléculas del constituyente funcional es alta, puede ser ventajoso que los poros se proporcionen incluso si el espesor es inferior al 30% del eje más largo. Lo mismo es válido donde una molécula del constituyente funcional tiene brazos laterales grandes y similares. También, incluso para capas delgadas, los poros pueden ser ventajosos donde las moléculas diana son bastante grandes o voluminosas y, por tanto, está perjudicado el acceso de las moléculas diana a los constituyentes funcionales.

Por lo tanto, se entenderá que, en ocasiones, podría ser ventajoso que el tamaño del material protector como se proporciona por la composición de la invención y como se describe en la presente memoria, se adapte a las necesidades específicas y pueda tener forma de tal manera que aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95% o el 100% del constituyente funcional, es decir, la proteína o compuesto de tipo proteína inmovilizado, en particular la enzima o compuesto de tipo enzima inmovilizado está cubierto por el material protector. Además, se entenderá que proporcionar poros podría ser ventajoso para espesores de capa de aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95% o 100% medido según la relación del eje más largo de la molécula constituyente funcional y el espesor de la capa. Normalmente, si la capa es más gruesa, los poros se vuelven más y más ventajosos.

Si se proporcionan poros, es ventajoso si el tamaño del poro está entre 1 nm y 10 nm, particularmente entre 2 nm y 9 nm, particularmente entre 3 nm y 8 nm, particularmente entre 4 nm y 7 nm, particularmente entre 4 nm y 6 nm, particularmente entre 4 nm y 5 nm. A partir de lo anterior, será obvio que el tamaño real del poro dependerá de la(s) molécula(s) diana específica(s) que tiene(n) que alcanzar el constituyente funcional. Es ventajoso si el tamaño del poro está dimensionado para permitir la difusión de moléculas al constituyente funcional para la interacción con el mismo durante el uso de la composición. Por tanto, los poros tendrán un tamaño correspondiente al menos al tamaño de la molécula diana. El experto en la técnica entenderá que los diferentes tamaños de poros indicados que se prefieren se referirán a diferentes moléculas diana específicas y/o a capas de diferentes espesores; para una capa más gruesa, un tamaño de poro más grande puede ser ventajoso dado que los poros más grandes permitirán la percolación de las moléculas diana al (a los) sitio(s) funcional(es) del constituyente funcional más fácilmente y/o en mayor grado.

A este respecto, se debería observar que el tamaño del poro puede estar influenciado y ajustado. Por lo tanto, el tamaño de los poros presentes en el material protector proporcionado por la composición de la invención y como se describe en la presente memoria, se puede adaptar a las necesidades específicas, en donde dicho tamaño de poro se elige de tal manera que permita la difusión de las moléculas, que van a interactuar con la proteína o compuestos de tipo proteína que forman dicho constituyente funcional. El tamaño del poro se puede regular mediante la selección de bloques de construcción particulares que tienen grupos funcionales deseados. En general, el uso de grupos

5 funcionales más grandes da como resultado una porosidad aumentada comparada con el uso de grupos funcionales más pequeños. Por ejemplo, se pueden utilizar los monómeros como bloques de construcción para la capa protectora, al menos parte de los cuales tienen tres grupos químicos que forman enlaces covalentes y un cuarto grupo que interactúa con el constituyente funcional de una manera no covalente. Además, se puede introducir un surfactante en la concentración crítica de micelas durante la formación de la capa protectora. Luego, se pueden añadir monómeros que llevan grupos grandes y voluminosos. Como un ejemplo, se pueden utilizar como octadecilsilano y trifeniilsilano, p. ej., octadeciltrimetoxisilano y trifeniltrietoxisilano donde los organosilanos son los monómeros de los bloques de construcción.

10 El experto en la técnica entenderá que incluso es posible variar el tamaño del poro a lo largo del camino desde la superficie de la capa protectora hasta la superficie del portador. Dicha variación es factible porque la construcción de la capa protectora es lo suficientemente lenta para variar durante el proceso de construcción las condiciones del proceso de tal manera que se obtienen diferentes tamaños de poros, p. ej., añadiendo ciertos componentes solo en una etapa posterior.

15 En una realización particularmente preferida, el material protector se puede modificar además químicamente en su superficie exterior para introducir funcionalidades adicionales, en particular mejorando la afinidad de la capa protectora producida por las moléculas, que van a interactuar con la proteína o compuestos de tipo proteína tal como, por ejemplo, un sustrato de una enzima, para crear un gradiente en la superficie de la capa protectora.

20 Es ventajoso si se proporcionan como una disolución acuosa los monómeros capaces de interactuar entre sí y el constituyente funcional inmovilizado. El uso de una disolución acuosa de monómeros ayuda a prevenir el daño de la conformación del constituyente funcional y, por lo tanto, mantiene la actividad del mismo.

25 Es ventajoso si los bloques de construcción construyen la capa protectora en una reacción de autoensamblaje. Aunque la polimerización puede ser, p. ej., una polimerización por radicales utilizando un iniciador unido a la superficie o soluble, monómeros insaturados solubles en agua o un reticulante soluble en agua, para el objeto de la presente invención, la reacción de polimerización es con frecuencia una policondensación, normalmente de precursores de sílice tal como el trialcóxisilano y tetraalcóxisilano en condiciones acuosas. El uso de una reacción de policondensación es, por lo tanto, una reacción de autoensamblaje preferida.

30 En la mayoría de los casos, se preferirá no añadir ciertos productos químicos que de otro modo se utilizan en la polimerización, tal como iniciadores y similares, que podrían perjudicar la actividad de las proteínas o compuestos de tipo proteína aún desprotegidos. Se observa que la policondensación puede efectuarse en disoluciones acuosas y que hacerlo así es particularmente preferido, ya que esto generalmente garantiza un entorno de reacción amigable con el medio ambiente, de modo que de esta manera, la conformación del constituyente funcional se conserva o al menos se ve afectada negativamente solo un pequeño grado de modo que la actividad de la misma se ve perjudicada solo en un pequeño grado, si es que existe alguna. Además, la policondensación se puede controlar fácilmente, permitiendo que se logren espesores de la capa protectora que sean compatibles con la protección de enzimas y la difusión del sustrato (tal como el eje mayor de la enzima donde el constituyente funcional es una enzima, o 50% más), lo que da como resultado una enzima protegida activa. Se observa que se pueden utilizar ventajosamente los monómeros de organo silano en este contexto.

40 Es ventajoso si el método para producir una composición según una de las reivindicaciones anteriores comprende además la etapa de detener la construcción de la capa protectora y/o la reacción de autoensamblaje del material protector para así obtener una capa protectora preferida con un espesor deseado. La detección de la polimerización del material protector sobre la superficie del material portador (y/o sobre la capa protectora embebida en la medida en que ya se ha construido dicha capa) se puede realizar deteniendo activamente la reacción de polimerización o deteniendo automáticamente la reacción de polimerización.

45 Es ventajoso si la interacción entre los bloques de construcción monoméricos para la capa protectora y el constituyente funcional inmovilizado se efectúa entre las cadenas laterales de aminoácidos de la proteína o compuesto de tipo proteína del constituyente funcional, particularmente basado en las interacciones de fuerza débil.

50 Dichas cadenas laterales de aminoácidos estarán presentes en la superficie de las moléculas del constituyente funcional que se va a embeber según la presente invención. Dado que diferentes cadenas laterales de ácido interactuarán a través de diferentes interacciones de fuerza débil, también es ventajoso si se proporciona una pluralidad de diferentes bloques de construcción de tal manera que los diferentes bloques de construcción interactúan con diferentes partes funcionales y/o diferentes cadenas laterales de aminoácidos. En este contexto, la interacción de fuerza débil se refiere a la unión no covalente y/o las interacciones p-p (aromáticas), interacciones de van der Waals, interacciones de enlace de H, interacciones iónicas. A partir del hecho de que aunque la interacción de los monómeros entre sí puede ser preferiblemente una reacción de polimerización, mientras que la interacción de los monómeros con el constituyente funcional es preferiblemente una interacción débil, se puede deducir que la interacción monómero-monómero no necesita ser la misma interacción que la interacción de los monómeros con el constituyente funcional. En cambio, normalmente la interacción será diferente. Además, la interacción de unión de los monómeros a la superficie del portador sólido puede ser una unión covalente.

- Si se utilizan monómeros que tienen al menos un grupo funcional para interactuar con el constituyente funcional inmovilizado, es preferible por lo tanto si estos se seleccionan de un alcohol, una amina, un carboxilato, una función aromática, un tiol, un tioéter, un guanidinio, un imidazol, una cadena alifática, una amida y/o un fenol, de modo que el grupo funcional pueda interactuar con una o más cadenas laterales de aminoácidos de los aminoácidos que residen sobre la superficie de la proteína o compuesto de tipo proteína mediante interacciones de fuerza débil.
- Se debería observar que, aunque se dispone de una pluralidad de monómeros diferentes que tienen dichos grupos funcionales, es particularmente preferido normalmente el uso de organosilanos.
- En una realización específica, la presente invención se refiere por lo tanto a la composición como se describe en la presente memoria, en donde el material protector es organosilíceo.
- Por tanto, en una realización particularmente preferida, se utilizan los monómeros de organo silano como bloques de construcción para construir la capa protectora embebiendo el constituyente funcional al menos parcialmente. En ese caso, es ventajoso si se utilizan monómeros de organo silano que tienen al menos un grupo funcional para interactuar con el constituyente funcional inmovilizado seleccionado de un alcohol, una amina, un carboxilato, una función aromática, un tiol, un tioéter, un guanidinio, un imidazol, una cadena alifática, una amida y/o un fenol, en particular un grupo funcional que interactúa con una o más cadenas laterales de aminoácidos de aminoácidos que residen en la superficie de la proteína o compuesto de tipo proteína mediante interacciones de fuerza débil. En este contexto, la interacción de fuerza débil se refiere a la unión no covalente y/o las interacciones p-p (aromáticas), interacciones de van der Waals, interacciones de enlace de H e interacciones iónicas (electroestáticas).
- Se seleccionarán preferiblemente los monómeros de organo silano del grupo que consiste en tetraortosilicato, carboxietilsilanotriol y/o bencilsilanos, propilsilanos, isobutilsilanos, n-octilsilanos, hidrosilanos, bis(2-hidroxietil)-3-aminopropilsilanos, aminopropilsilanos, ureidopropilsilanos, (N-acetilglicil)-3-aminopropilsilanos en particular seleccionados de benciltrietoxisilanos, propiltrietoxisilano, isobutiriltrietoxisilano, n-octiltrietoxisilano, hidroximetiltrietoxisilano, bis(2-hidroxietil)-3-aminopropiltrietoxisilano, aminopropiltrietoxisilano, ureidopropiltrietoxisilano(N-acetilglicil)-3-aminopropiltrietoxisilano y/o seleccionado de benziltrimetoxisilano, propiltrimetoxisilano, isobutiltrimetoxisilano, n-octiltrimetoxisilano, hidroximetiltrimetoxisilano, bis(2-hidroxietil)-3-aminopropiltrimetoxisilano, aminopropiltrimetoxisilano, ureidopropiltrimetoxisilano(N-scetilglicil)-3-aminopropiltrimetoxisilano y/o seleccionado de benziltrihiidroxiétoxisilano, propiltrihiidroxiétoxisilano, isobutiltrihiidroxiétoxisilano, n-octiltrihiidroxiétoxisilano, hidroximetiltrihiidroxiétoxisilano, bis(2-hidroxietil)-3-aminopropiltrihiidroxiétoxisilano, aminopropiltrihiidroxiétoxisilano, ureidopropiltrihiidroxiétoxisilano, (N-acetilglicil)-3-aminopropiltrihiidroxiétoxisilano. Se debería observar que estos silanos se prefieren como
- están disponibles comercialmente. Por tanto, será obvio para el experto en la técnica en vista de la presente descripción que también podrían utilizarse otros organo silanos disponibles en la actualidad o en el futuro y que, por tanto, aunque indica los monómeros preferidos, la lista no excluye otros monómeros de la descripción.
- Como las diferentes cadenas laterales amino de la superficie estarán generalmente presentes en la superficie de un constituyente funcional, en una realización particularmente preferida se utilizan diferentes monómeros de organo silano en lugar de un solo monómero. El experto medio en la técnica será consciente de que los diferentes aminoácidos de superficie interactuarán a través de diferentes mecanismos de interacción (unión). Esto también es válido para los monómeros que tienen diferentes grupos funcionales y se prefiere utilizar una mezcla de monómeros optimizada con respecto a las cantidades de diferentes aminoácidos de superficie.
- Preferiblemente, el método según la presente invención comprende, por lo tanto, las etapas de analizar o determinar una estructura superficial de la proteína o compuesto de tipo proteína antes de proporcionar los bloques de construcción, y elegir los bloques de construcción correspondientes a la estructura superficial. Esta etapa puede ser útil para permitir una unión específica de la proteína o compuesto de tipo proteína al material protector, particularmente, si la proteína o compuesto de tipo proteína tiene una estructura conocida como se mencionó anteriormente.
- Si la proteína o compuesto de tipo proteína tiene una estructura conocida, se pueden identificar funciones químicas sobre la superficie de la proteína o compuesto de tipo proteína. Por lo tanto, la selección de bloques de construcción utilizados para preparar el material protector puede depender de la estructura conocida de la proteína o compuesto de tipo proteína para adaptar la afinidad del material protector. La elección de los bloques de construcción, que se pueden utilizar para preparar el material protector, puede depender de la estructura conocida de la proteína o compuesto de tipo proteína para adaptar la afinidad del material protector a su necesidad respectiva. La composición del material protector depende de los compuestos presentes en las mezclas de reacción, tales como bloques de construcción estructurales (p. ej., tetraetilortosilicato (TEOS)) y/o bloques de construcción protectores (p. ej., tetraetilortosilicato (TEOS), 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES), n-propiltrietoxisilano (PTES), isobutiltrietoxisilano (IBTES), hidroximetiltrietoxisilano (HTMEOS), benciltrietoxisilano (BTES), ureidopropiltrimetoxisilano (UPTES), carboxietiltrietoxisilano (CETES)) y una autoorganización previa de estos bloques de construcción alrededor de la proteína o compuesto de tipo proteína a través de interacciones de fuerza débil tales como enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas o interacciones de van-der-Waals, apilamiento π - π [(apilamiento (π - π)).

Por consiguiente, es ventajoso si para al menos un constituyente funcional, se determina la cantidad respectiva de al menos varios de los aminoácidos de superficie seleccionados del grupo que consiste en Phe, Tyr, Trp, Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Pro, Ser, Thr, Asp, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His y se utilizan diferentes monómeros de acuerdo con la determinación.

5 Por lo tanto, es ventajoso si se determina la cantidad de al menos uno de Phe, Tyr, Trp como aminoácidos de superficie de el al menos un constituyente funcional. Dicha determinación se puede referir o a la cantidad de uno solo de dichos aminoácidos de superficie o a la cantidad de varios de dichos aminoácidos de superficie, preferiblemente la suma de todos ellos. Luego, se selecciona según esta determinación, una cantidad de monómero(s) que tiene(n) un grupo funcional que interactúa con los aminoácidos de superficie Phe, Tyr, Trp del constituyente funcional a través de interacciones p-p (aromáticas), en particular una cantidad de bencilsilanos, en particular uno o más de un benciltrietoxisilano, benciltrimetoxisilano o benciltrihidroxietoxisilano. Se observa que la determinación se puede referir o a la cantidad de uno solo de dichos aminoácidos de superficie o a la cantidad de varios de dichos aminoácidos de superficie, preferiblemente (la suma de) todos ellos. Luego, cuando la cantidad de monómero(s) que tiene(n) un grupo funcional que interactúa con los aminoácidos de superficie mencionados del constituyente funcional se establece según esta determinación, que se pueden seleccionar uno o más monómeros que tienen la interacción respectiva para construir la capa protectora.

Además y/o como una alternativa, se determina la cantidad de al menos una Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Pro como aminoácidos de superficie de el al menos un constituyente funcional y una cantidad de monómero que tiene un grupo funcional que interactúa con los aminoácidos de superficie Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Pro del constituyente funcional a través de las interacciones de van der Waals, se seleccionan según la determinación, en particular una cantidad de al menos uno de los propilsilanos, isobutilsilanos, n-octilsilanos en particular uno de un propiltrimetoxisilano, isobutiltrietoxisilano o un n-octiltrietoxisilano y/o uno de propiltrietoxisilano, isobutiltrietoxisilano, n-octiltrietoxisilano y/o propiltrihidroxietoxisilano, isobutiltrihidroxietoxisilano, n-octiltrihidroxietoxisilano. De nuevo, la determinación se puede referir o a la cantidad de uno solo de dichos aminoácidos de superficie o a la cantidad de varios de dichos aminoácidos de superficie, preferiblemente la suma de todos ellos. Luego, cuando la cantidad de monómero(s) que tiene(n) un grupo funcional que interactúa(n) con los aminoácidos de superficie mencionados del constituyente funcional se establece según esta determinación, que se pueden seleccionar uno o más monómeros que tienen la interacción respectiva para construir la capa protectora.

Además y/o como una alternativa, se determina la cantidad de al menos una de Ser, Thr, Asp, Glu, Asn, Gln, Tyr como aminoácidos de superficie de el al menos un constituyente funcional y una cantidad de monómero que tiene un grupo funcional que interactúa con los aminoácidos de superficie Ser, Thr, Asp, Glu, Asn, Gln, Tyr del constituyente funcional a través de las interacciones de enlace de H se seleccionan según la determinación, en particular una cantidad de al menos uno de hidroxisilanos, bis(2-hidroxietil)-3-aminopropilsilanos, en particular uno de hidroximetiltrietoxisilano, bis(2-hidroxietil)-3-aminopropiltrimetoxisilano, y/o uno de hidroximetiltrimetoxisilano, bis(2-hidroxietil)-3-aminopropiltrimetoxisilano y/o uno de hidroximetiltrihidroxietoxisilano, bis(2-hidroxietil)-3-aminopropiltrihidroxietoxisilano. De nuevo, cuando la cantidad de monómero(s) que tiene(n) un grupo funcional que interactúa(n) con los aminoácidos de superficie mencionados del constituyente funcional se establece según esta determinación, que se pueden seleccionar uno o más monómeros que tienen la interacción respectiva para construir la capa protectora.

Además y/o como una alternativa, se determina la cantidad de al menos una de Asp, Glu como aminoácidos de superficie de el al menos un constituyente funcional y una cantidad de monómero que tiene un grupo funcional que interactúa con los aminoácidos de superficie Asp, Glu del constituyente funcional a través de interacciones iónicas se selecciona según la determinación, en particular una cantidad de aminopropilsilanos, en particular al menos uno de aminopropiltrimetoxisilano, aminopropiltrihidroxietoxisilano aminopropiltrietoxisilano. De nuevo, cuando la cantidad de monómero(s) que tiene(n) un grupo funcional que interactúa(n) con los aminoácidos de superficie mencionados del constituyente funcional se establece según esta determinación, que se pueden seleccionar uno o más monómeros que tienen la interacción respectiva para construir la capa protectora.

Se observa que algunas cadenas laterales de aminoácidos de superficie pueden interactuar a través de diferentes mecanismos. Donde las mezclas de monómeros se adaptan según la cantidad de cadenas laterales específicas de aminoácidos de superficie, esto se puede tener en cuenta.

Lo que se desprende a partir de lo anterior es que, p. ej., cuando se basa en un análisis de la superficie de aminoácidos de la enzima diana, la mayoría de los aminoácidos presentes en la superficie de la enzima que define el constituyente funcional están cargados negativamente, luego deberían añadirse más organosilanos que tienen grupos funcionales cargados positivamente en la mezcla de bloques de construcción. De esta manera, los organosilanos de la mezcla interactuarán mejor (de manera no covalente) con la enzima a proteger mediante embebido para su uso.

Mientras el portador puede ser cualquier portador sólido, p. ej., un chip o similar, es ventajoso en la mayoría de las aplicaciones si el portador sólido es un portador en forma de partículas, en particular con un tamaño de partícula en un intervalo de entre 20 y 1000 nm, particularmente de entre 200 y 500 nm, particularmente entre 300 y 400 nm.

- En este contexto, se debería observar que el número de moléculas de proteínas o compuestos de tipo proteína, es decir, el número de moléculas de constituyentes funcionales individuales que pueden o estarán unidas a una partícula dada dependerá de la relación del tamaño de la partícula portadora al tamaño de dicha molécula de proteína o compuesto de tipo proteína. Para partículas más grandes, obviamente puede haber variaciones estadísticas de dicho número. Si la proteína o compuesto de tipo proteína tiene un tamaño similar como al de la nanopartícula, puede unirse una molécula de proteína o compuesto de tipo proteína por partícula. Un tamaño similar se refiere en este caso a una diferencia en tamaño que está en el intervalo de entre 0,5% y 10%.
- En una realización, la relación de tamaño de partícula a proteína o compuesto de tipo proteína es de tal manera que permite la unión de entre 10 a 200, particularmente 50-250, particularmente 20-150 proteínas o compuestos de tipo proteico por nanopartícula. En una realización específica, la nanopartícula tiene un tamaño que permite la unión de 200 proteínas o compuestos de tipo proteína por nanopartícula. Se prefiere una relación tal porque con una relación tal, añadir una pequeña cantidad de composición en un recipiente del proceso, organismo o similar equivaldrá a la adición de una cantidad bastante grande de constituyentes funcionales activos.
- Sin embargo, se debería observar que utilizar un portador en forma de partículas bastante grande permite separar la composición de un fluido mediante el filtrado después del uso. Mientras que en algunos casos, podría ser más preferido utilizar un portador de partículas pequeño, p. ej., para permitir el transporte de la composición en un organismo vivo, también puede haber ocasiones donde se utilizarán partículas de mayor tamaño dentro del alcance de la presente invención, particularmente partículas con un tamaño de al menos 1000 nm y hasta 100 μm .
- Por tanto, el portador puede ser una nanopartícula, particularmente una nanopartícula seleccionada del grupo que consiste en nanopartícula orgánica, nanopartícula inorgánica, nanopartícula de material compuesto orgánico-inorgánico, nanopartícula orgánica de autoensamblaje, nanopartícula de sílice mesoporosa (SNP, en inglés silica nanoparticle), nanopartícula de oro y nanopartícula de titanio.
- Independientemente del tamaño del portador, el material portador puede tener una superficie de óxido de silicio que es particularmente preferida donde se utilizan organo silanos como monómeros.
- Es posible y ventajoso si dicho constituyente funcional seleccionado de una proteína y un compuesto de tipo proteína es una enzima o compuesto de tipo enzima, particularmente una enzima o compuesto de tipo enzima, que se selecciona del grupo que consiste en oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y/o ligasas.
- También se busca protección para una composición que comprende un portador sólido, al menos un constituyente funcional, seleccionado de una proteína y un compuesto de tipo proteína, e inmovilizado sobre la superficie del portador sólido, y una capa protectora para proteger el constituyente funcional embebiendo el constituyente funcional al menos parcialmente, en donde la capa protectora para proteger el constituyente funcional es una capa construida con monómeros de bloques de construcción que son capaces de interactuar entre sí y el constituyente funcional inmovilizado.
- De nuevo, la imbibición será de tal manera que (al menos una mayoría o una gran fracción de) el constituyente funcional permanecerá embebido hasta su uso, preferiblemente hasta el final de su uso, y no está destinado a ser eliminado por lavado ni la eliminación por lavado tendrá lugar durante el uso previsto.
- El lector medio experto es consciente que las proteínas comprenden una clase extremadamente heterogénea de macromoléculas biológicas. Muchas son inestables cuando no están en sus entornos nativos. Si no se mantienen ciertas condiciones del tampón, las proteínas extraídas pueden no funcionar correctamente o permanecer solubles. Las proteínas pueden perder la integridad estructural y la actividad como resultado de temperaturas subóptimas, proteólisis, agregación y condiciones del tampón subóptimas.
- Según la presente invención, el material protector de la composición como se describe en la presente memoria proporciona protección para la proteína o compuesto de tipo proteína, particularmente la enzima o compuesto de tipo enzima a condiciones ambientales, que se desvían de las condiciones nativas.
- En particular, la proteína o compuesto de tipo proteína, particularmente la enzima o compuesto de tipo enzima, está protegido contra:
- a) un pH subóptimo; y/o
 - b) estrés químico; y/o
 - c) estrés biológico; y/o
 - d) disolventes; y/o
 - e) estrés físico

Un "pH subóptimo" se refiere a un pH, que difiere del pH óptimo para el al menos una proteína o compuesto de tipo proteína en un valor de, p. ej., +/-5, +/-4, +/-3, +/-2, +/-1, +/-0,5 unidades de pH; el experto medio en la técnica

entenderá que donde la composición de la invención estará sometida a condiciones más extremas, la capa protectora se puede adaptar a tales condiciones.

5 El término "estrés químico" como se emplea en la presente memoria comprende, pero no se limita a, condiciones causadas por dilución en el disolvente, contaminación con reactivos no deseados, p. ej., pesticidas, insecticidas, aire y/o agua contaminada, metales pesados tal como mercurio o plomo, asbestos o residuos radiactivos, compuestos utilizados en quimioterapia, o toxinas. Especialmente las enzimas son inestables en disolventes que son diferentes de su sistema tampón óptimo.

10 El término "estrés biológico" como se emplea en la presente memoria comprende, pero no se limita a, condiciones causadas por la actividad de proteasa, estrés oxidativo, actividad de caspasa, inhibidores de enzimas naturales, baja concentración de sustrato, exposición a luz brillante, exposición a luz UV, niveles bajos de ATP, contaminación con proteínas no deseadas, actividad de fosfatasa y metabolismo de fármacos.

El término "estrés físico" como se emplea en esta memoria comprende, pero no se limita a, fuerzas de cizallamiento, sequedad, presión y estrés inducido por vacío.

15 En una realización, la presente invención se refiere a la composición como se describe en la presente memoria, en donde el material protector proporciona protección para la proteína o compuesto de tipo proteína frente a temperaturas subóptimas, que pueden conducir a la inactivación y/o desnaturalización de la proteína desprotegida.

20 Si la proteína es una enzima, la enzima inmovilizada y protegida como se describe en la presente memoria puede conservar su actividad e integridad estructural en temperaturas subóptimas, que son más altas que la temperatura de reacción óptima y donde la enzima de interés puede tener una actividad reducida. En particular, la invención proporciona una composición como se describe en la presente memoria, en donde el material protector proporciona protección para la proteína o compuesto de tipo proteína contra temperaturas elevadas, que exceden la temperatura óptima para la proteína o compuesto de tipo proteína desprotegido en 60°C, particularmente en 50°C, particularmente en 40°C más alto, particularmente en 30°C, particularmente en 20°C, particularmente en 10°C, particularmente en 5°C. En una realización específica, la proteína o compuesto de tipo proteína es una enzima o compuesto de tipo enzima. La encapsulación ajustada lograda según la invención protege así el constituyente funcional incluso en condiciones extremadamente adversas.

Es posible y ventajoso, por lo tanto, si la composición se utiliza en un proceso catalítico y/o en otros procesos industriales; la composición se puede utilizar en diversos procesos catalíticos.

30 En particular, es posible utilizar la composición de la invención en un proceso catalítico en donde durante el proceso la composición se somete a al menos uno de un pH diferente del pH óptimo del constituyente funcional, en particular de tal manera que el valor de pH difiera al menos en +/-0,5 unidades de pH y/o hasta +/-5 unidades de pH desde el pH óptimo para el constituyente funcional y/o a estrés químicos; y/o a estrés biológicos; y/o a disolventes; y/o a estrés físico; y/o a temperaturas elevadas que exceden la temperatura óptima para el constituyente funcional en al menos 5°C; y/o hasta 60°C, particularmente en 50°C, particularmente en 40°C más alto, particularmente en 30°C, particularmente en 20°C, particularmente en 10°C; y/o a temperaturas reducidas, que se desvían de la temperatura óptima para el constituyente funcional en al menos 5°C; y/o hasta 60°C.

35 En una realización, la presente invención se refiere a la composición como se describe en la presente memoria, en donde el material protector proporciona protección para la proteína o compuesto de tipo proteína contra temperaturas reducidas, que son más bajas que la temperatura óptima y que pueden conducir a la inactivación y/o desnaturalización de la proteína desprotegida.

40 Si la proteína es una enzima, la enzima inmovilizada y protegida como se describe en la presente memoria, puede conservar su actividad e integridad estructural a temperaturas subóptimas, que son más bajas que la temperatura de reacción óptima y donde la enzima de interés puede tener una actividad reducida. En particular, la invención proporciona una composición como se describe en la presente memoria, en donde el material protector proporciona protección para la proteína o compuesto de tipo proteína contra temperaturas reducidas, que se desvían de la temperatura óptima para la proteína o compuesto de tipo proteína desprotegido en 60°C, particularmente en 50°C, particularmente en 40°C, particularmente en 30°C, particularmente en 20°C, particularmente en 10°C, particularmente en 5°C. En una realización específica, la proteína o compuesto de tipo proteína es una enzima o compuesto de tipo enzima.

45 En otra realización de la presente invención, la composición como se describe en la presente memoria es un sistema biocatalítico. En particular, la al menos una proteína o compuesto de tipo proteína de interés es una enzima o compuesto de tipo enzima.

50 En particular, la enzima o compuesto de tipo enzima se selecciona del grupo de las oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y/o ligasas tales como, por ejemplo, una lacasa, una peroxidasa, una fosfatasa, una oxigenasa, una reductasa, una proteasa, una amilasa y/o una esterasa.

55

Por tanto, en particular, la composición según la presente invención y como se describe en la presente memoria se puede utilizar en el procesamiento de alimentos o elaboración de cerveza. Por lo tanto, la composición según la presente invención y como se describe en la presente memoria se puede utilizar en el procesamiento de alimentos, en particular para el procesamiento de productos lácteos, elaboración de cerveza, para el procesamiento de zumo de fruta, en particular la depuración del zumo de fruta, la producción de azúcar, la producción de carne tierna, la producción de vino, etc. Además, la composición según la presente invención y como se describe en la presente memoria se puede utilizar en procesos de descontaminación, procesos de desintoxicación, en la industria del almidón, industria del papel, industria de biocombustibles, industria del caucho, industria fotográfica o en la producción de detergentes. En particular, la composición descrita según la presente invención se puede reciclar para reutilizarla en ciclos de reacción adicionales. Aquí, es altamente ventajoso el uso de la composición según la invención para procesos catalíticos.

Además, la composición de la presente invención también se puede utilizar en procesos de descontaminación, particularmente procesos de descontaminación dependientes de enzimas. Por ejemplo, la composición se puede utilizar para eliminar o degradar compuestos químicos no deseados, tal como hidrocarburos, hidrocarburos aromáticos, pesticidas, toxinas, disolventes, productos químicos agrícolas y/o metales pesados. La composición de la presente invención, por lo tanto, se puede utilizar para limpiar tierra o agua contaminada. Por ejemplo, la composición según la presente invención se puede utilizar, por lo tanto, para purificar las aguas residuales eliminando o degradando un contaminante.

La composición según la presente invención se puede utilizar directamente para la preparación de sistemas de reactor de lecho empacado para tratar el agua mediante un proceso de percolación. Una posible tecnología adicional es el embebido de proteínas o compuestos de tipo proteína en membranas de filtración para el tratamiento de efluentes. Esta aplicación se puede ver en el formato de un filtro para la depuración del agua doméstica, que puede ser relevante en los países en desarrollo.

En principio, la composición según la presente invención se puede utilizar en cualquier proceso catalítico, es decir, en cualquier proceso que esté basado en el uso de al menos una proteína particular, particularmente una enzima.

El uso de la composición según la presente invención en lugar de la proteína o enzima nativa tiene la ventaja de que la proteína o enzima se puede reciclar y, por lo tanto, se puede utilizar de nuevo en otro ciclo de reacción. Esto reduce el costo y el esfuerzo para producir o aislar la proteína de interés, en particular, la enzima de interés. Si se utiliza la composición en lugar de la proteína de interés desprotegida, la cantidad total requerida de proteína de interés es menor, ya que se puede lograr más de una sola reacción biocatalítica. Además, la composición de la presente invención se puede producir a gran escala, lo que la hace especialmente adecuada para el uso en procesos de fabricación industrial, donde a menudo se requiere un alto rendimiento de sustrato. Las proteínas aisladas o recombinantes, especialmente las enzimas, han encontrado varias aplicaciones dentro de una amplia variedad de ramas industriales. Las enzimas se utilizan, por ejemplo, en la industria alimentaria, industria química y la ingeniería de proteínas. En particular, se pueden utilizar para la producción de aminoácidos enantioméricamente puros, azúcares raros, tales como fructosa, penicilina y derivados de los mismos, agentes de lavado, así como otros compuestos químicos. La enzima inmovilizada y protegida según la presente invención también se puede optimizar genéticamente para aumentar su actividad biocatalítica.

El hecho de que la composición de la presente invención proporciona una protección particularmente buena del constituyente funcional permite así el uso de la composición en condiciones extremadamente adversas. Esto es ventajoso ya que con frecuencia abre el camino a aplicaciones completamente nuevas o al uso de material de otro modo demasiado costoso de utilizar debido a la rápida disminución de la actividad y la necesidad resultante, por lo tanto, de aumentar la cantidad de constituyentes funcionales (desprotegidos).

La presente invención se refiere además a la composición como se describe en la presente memoria, en donde la composición no es tóxica. Además, la composición según la presente invención es susceptible de producción a gran escala.

Por lo tanto, es posible y ventajoso si la composición se utiliza en terapia de humanos o animales, particularmente en terapia de mamíferos. La composición de la presente invención como se describe en la presente memoria se puede formular por lo tanto como una composición farmacéutica, de modo que se puede utilizar en terapia humana o animal.

En particular, la composición se puede utilizar en la terapia de uno de síndrome de deficiencia de esfingomielinasa (ASMD), enfermedad de Niemann-Pick (NPD), enfermedades de almacenamiento lisosomal, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, mucopolisacaridosis (MPS) I, MPS II, MPS VI y enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II, cáncer, enfermedades alérgicas, enfermedades metabólicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunes, enfermedades del sistema nervioso, enfermedad linfática y enfermedad viral.

La composición según la invención como se describe en la presente memoria se puede utilizar en la terapia de reemplazo enzimático (ERT, en inglés enzyme replacement therapy) en pacientes que padecen una enfermedad, que se induce por la deficiencia o ausencia de una enzima particular. La composición que comprende la enzima deficiente o ausente en el formato inmovilizado y protegido de la invención se puede administrar sola o en combinación con otros

fármacos para el uso en la terapia de dicha enfermedad en animales, particularmente en mamíferos, más particularmente en humanos.

5 En particular, en la terapia contra el cáncer, la composición según la invención y como se describe en la presente memoria puede proporcionar una enzima protegida por una capa protectora, la actividad catalítica de la cual conduce a una disminución de uno o más metabolitos, que son necesarios por las células cancerosas para sobrevivir.

10 Por ejemplo, en ciertos cánceres, las células cancerosas carecen de una enzima, p. ej. la argininosuccinato sintetasa, que hace que estas células sean auxotróficas para la arginina. La disminución del nivel de arginina proporcionando una composición según la presente invención y como se describe en la presente memoria que comprende una enzima degradadora de arginina tal como, por ejemplo, una arginasa protegida por una capa protectora, sería fatal para las células cancerosas, mientras que las células normales permanecen no afectadas o al menos no están fatalmente afectadas.

En otro aspecto, la composición según la presente invención y como se describe en la presente memoria, se puede utilizar para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o condición o síntomas de dicha enfermedad.

15 La composición farmacéutica puede comprender además de la composición de la invención y como se describe en la presente memoria un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición de la invención se puede proporcionar en una cantidad terapéuticamente y/o profilácticamente eficaz.

20 Por ejemplo, la composición de la invención y como se describe en la presente memoria se puede formular como una crema, una tableta, píldora, parche bioadhesivo, esponja, película, pastilla, caramelo duro, oblea, esfera, piruleta, estructura en forma de disco o aerosol.

La composición se puede administrar a un sujeto que la necesite mediante administración sistémica, intranasal, bucal, oral, transmucosal, intratraqueal, intravenosa, subcutánea, del tracto intraurinario, intravaginal, sublingual, intrabronquial, intrapulmonar, transdérmica o intramuscular.

25 La composición según la presente invención se puede utilizar además para prevenir la degradación de una proteína o compuesto de tipo proteína, en particular la degradación proteasomal de una proteína o compuesto de tipo proteína después de la administración en el cuerpo. Las proteínas se etiquetan para la degradación proteasomal con una proteína pequeña, denominada ubiquitina. El uso de la composición según la invención puede prevenir el etiquetado de ubiquitina de la proteína o compuesto de tipo de proteico de interés y, por lo tanto, también previene la degradación de la proteína o compuesto de tipo proteína por proteasomas. Por consiguiente, los niveles de la proteína o compuesto de tipo proteína administrado se pueden mantener estables durante un período más largo en la sangre y el tejido del paciente.

30 A partir de lo anterior, se entenderá que parte de la invención puede considerarse, entre otras, que proporciona una composición que comprende al menos una proteína o compuesto de tipo proteína inmovilizado en la superficie de un portador, en particular un portador sólido, en donde dicha proteína o compuesto de tipo proteína está embebido total o parcialmente en un material protector comprendido por bloques de construcción autoensamblables. Estos bloques de construcción del material protector pueden experimentar una reacción autoensamblable sobre la superficie del portador y alrededor de la proteína o compuesto de tipo proteína inmovilizado sobre la superficie del portador para establecer un nanoentorno poroso alrededor de la proteína o compuesto de tipo proteína inmovilizado. El establecimiento de dicho nanoentorno poroso se puede lograr mediante la presencia de grupos funcionales seleccionados, que son proporcionados por el material protector y que los grupos interactúan con los grupos químicos de la proteína o compuesto de tipo proteína, de tal manera que la conformación nativa de la proteína o compuesto de tipo proteína se estabiliza y se conserva su función.

35 Según una realización aún más detallada y específica, se puede entender que la presente invención proporciona, entre otras, una composición que comprende al menos una proteína o compuesto de tipo proteína inmovilizado en la superficie de un portador, en particular un portador sólido, en donde dicha proteína o compuesto de tipo proteico está embebido total o parcialmente en un material protector comprendido por bloques de construcción autoensamblables.

40 Como se emplea en la presente memoria, puede interpretarse que el material protector se refiere a un material que es capaz de una reacción de polimerización, material que se puede proporcionar a la superficie del material portador. Preferiblemente, el material protector es un material monomérico o contiene dicho material monomérico en una gran parte y se proporciona en fase líquida. Durante la polimerización, el material protector puede autoensamblarse sobre la superficie del portador y alrededor de la al menos una proteína o compuesto de tipo proteína inmovilizado en la superficie del portador sólido. De esta manera, la al menos una proteína o compuesto de tipo proteína queda embebido en una capa protectora que crece desde la superficie del material portador hacia la dirección de la al menos una proteína o compuesto de tipo proteína o desde la al menos una proteína o compuesto de tipo proteína hacia la dirección de la superficie del material de portador o ambos. Después de ser polimerizado, el material protector normalmente está en fase sólida.

Aplicando un método preferido según la invención, el material protector polimerizado proporciona un nanoentorno poroso alrededor de la proteína o compuesto de tipo proteína, que luego es embebido total o parcialmente por el material protector. En una realización preferida, el material protector será(n) monómero(s) de organosilano(s).

5 En una realización preferida, la composición se obtiene mediante inmovilización enzimática efectuada con modificación APTES de sílice y química de reticulación del glutaraldehído, luego se efectúa el autoensamblaje de monómeros de organosilanos alrededor de la enzima como una plantilla y una policondensación controlada de monómeros de organosilanos en agua con la necesidad de utilizar aditivos durante la reacción de policondensación.

10 Donde se emplea en la presente memoria la expresión "proteína o compuesto de tipo proteína completamente embebido", significará que la proteína o compuesto de tipo proteína de interés según la invención está cubierto al 100% por el material protector autoensamblado como se define en diversas realizaciones de las presentes invenciones.

15 La expresión "proteína o compuesto de tipo proteína parcialmente embebido" y expresiones similares como se emplea en esta memoria significará que la proteína o compuesto de tipo proteína según la invención no está completamente cubierto por el material protector autoensamblado como se define en diversas realizaciones de las presentes invenciones, por lo tanto, la proteína o el compuesto de tipo proteína no está completamente embebida en el material protector. En diversas realizaciones de la invención, es posible que no menos del 5% de la proteína o compuesto de tipo de interés esté cubierto por el material protector, aunque normalmente se cubrirá más de al menos el 10%, mejorando así la protección del constituyente funcional. Aunque tal imbibición mínima a veces puede ser suficiente, en general, se prefiere un grado aún mayor de imbibición para una mejor protección y retención del constituyente funcional, y por tanto, normalmente se proporcionará al menos el 50% de imbibición. En una realización particularmente preferida, la imbibición será incluso al menos el 80%, particularmente al menos el 90%, particularmente el 99% de la proteína o compuesto de tipo proteína de interés que está cubierto por el material protector autoensamblado. Por tanto, es obvio que se prefiere altamente elegir un grado tal de imbibición que el constituyente funcional generalmente no será eliminado por lavado. Suponiendo una forma circular o cilíndrica de las moléculas del constituyente funcional, será obvio que mientras se utilizará una imbibición de al menos el 50%, se prefiere normalmente la imbibición de al menos el 70% por simples consideraciones geométricas, pero dependiendo de la presencia de cadenas laterales y similares, un grado menor, p. ej., el 30%, ya podría ser suficiente para evitar la separación por lavado. De nuevo, se debería observar que se puede determinar fácilmente una medida de eliminación por lavado y que, por consiguiente, se puede determinar un espesor suficiente de la capa protectora o el grado de imbibición.

20 Por otra parte, no es necesario que el espesor de la capa de protección de retención del constituyente funcional sea excesivo para mejorar la protección. Tanto la retención de las moléculas funcionales por el material reticulado se superpone de forma adecuada a las moléculas constituyentes funcionales en un alto grado como la protección contra el ataque por sustancias químicas será suficiente si las moléculas constituyentes funcionales están casi cubiertas o completamente cubiertas (es decir, al 100%) sin la necesidad de aumentar aún más el espesor de la capa de protección. Aunque se podría obtener alguna protección adicional contra el ataque de productos químicos si se reduce la difusión por una capa más gruesa, casi no hay necesidad de tener una capa más gruesa que aproximadamente el 200%. Normalmente, la capa será más pequeña que el 150% de la longitud del eje más largo del constituyente funcional y, con mayor frecuencia, la capa será más pequeña que aproximadamente el 120%, en casos preferidos incluso no excederá el 110%. Incluso para pequeñas moléculas constituyentes funcionales, las fuerzas de retención del material reticulado sobre la capa serán suficientes en la mayoría de los casos e incluso en condiciones abrasivas y similares, la resistencia de dicha capa será suficiente para la mayoría de los procesos.

25 También se ha descrito ya anteriormente sobre que en una realización específica de la invención, la proteína o compuesto de tipo proteína se une a la superficie del material portador mediante unión covalente. Una proteína o compuesto de tipo proteína unido covalentemente contribuye a una superficie estable del material portador que contiene la proteína o compuesto de tipo proteína que puede proporcionar condiciones estables para la polimerización del material protector.

30 El experto medio en la técnica también entenderá que, en una realización específica, el material protector que se proporciona en la composición de la presente invención y como se describe en la presente memoria puede estar compuesto de bloques de construcción monoméricos, que se autoensamblan sobre la superficie libre del portador y alrededor de la proteína inmovilizada o compuesto de tipo proteína inmovilizado en la superficie del portador. Luego los bloques de construcción monoméricos del material protector se autoensamblan sobre la superficie libre del portador y forman enlaces, en particular enlaces covalentes, con grupos reactivos proporcionados sobre la superficie del portador y mediante los bloques de construcción autoensamblables, de tal manera que se genera una capa protectora, que se fija (por fuerzas de unión bastante fuertes) a la superficie del portador y proporciona un nanoentorno poroso alrededor de la proteína o compuesto de tipo proteína inmovilizado. El nanoentorno poroso protege la al menos una proteína o compuesto de tipo proteína inmovilizado en la superficie del portador sólido contra diverso estrés que incluyen estrés ambiental, estrés por pH, estrés biológico, estrés mecánico y/o estrés físico como se define en la presente memoria. El nanoentorno poroso permite además que las moléculas pequeñas se muevan a través de los poros e interactúen con la proteína o el compuesto de tipo proteína inmovilizado de interés. El experto medio en la

técnica entenderá que, aunque proporcionar poros en la capa protectora podría reducir la fuerza de retención proporcionada por el material reticulado, tales fuerzas serán aún más que adecuadas.

5 En una realización particularmente preferida, el material protector se puede modificar además químicamente en su superficie exterior para introducir funcionalidades adicionales, en particular mejorando la afinidad de la capa protectora producida por las moléculas, que van a interactuar con la proteína o compuestos de tipo proteína tal como por ejemplo, un sustrato de una enzima, para crear un gradiente en la superficie de la capa protectora.

10 Según la invención como se describe en la presente memoria, es posible proteger el sitio catalítico de una enzima o compuesto de tipo enzima embebido, retenido, utilizado como un constituyente funcional y proteger y preservar su funcionalidad. Por tanto, dicha enzima o compuesto de tipo enzima inmovilizado y protegido como se proporciona en la composición de la invención y como se describe en la presente memoria tiene, por ejemplo:

a) una actividad aumentada en condiciones de estrés cuando se compara con la enzima libre desprotegida; y/o

b) una capacidad de recuperación aumentada para uso en operación continua cuando se compara con la enzima libre desprotegida.

15 Una "actividad aumentada" como se emplea en la presente memoria se entiende que se refiere a una actividad de la enzima o compuesto de tipo enzima inmovilizado y protegido, que es mayor que la actividad de la misma enzima o compuesto de tipo enzima cuando se proporciona en un formato no unido y no protegido, cuando se ensaya en el mismo sistema de ensayo y en condiciones idénticas. En particular, dicho aumento es alrededor de 5%,
 20 particularmente alrededor de 10%, particularmente alrededor de 15%, particularmente alrededor de 20%, particularmente alrededor de 25%; particularmente alrededor de 30%, particularmente alrededor de 35%, particularmente alrededor de 40%, particularmente alrededor de 45%, particularmente alrededor de 50%, particularmente alrededor de 55%, alrededor de 60%, particularmente alrededor de 70%, particularmente alrededor de 80%, particularmente alrededor de 90%, particularmente alrededor de 100%, particularmente alrededor de 110%, particularmente alrededor de 120%, particularmente alrededor de 130%, particularmente alrededor de 140%, particularmente alrededor de 150%, particularmente alrededor de 160%, particularmente alrededor de 165%. Se
 25 entenderá que la cantidad exacta de aumento de actividad variará con el constituyente funcional, parámetros tales como el tamaño de poro necesario, espesor de la capa y los parámetros del proceso, pero que generalmente, se puede esperar un aumento de al menos el 10%.

30 Luego, se entiende que una "capacidad de recuperación aumentada" para el objeto de la presente invención se refiere a la capacidad de la composición según la presente invención de ser reutilizada varias veces en uso industrial o de laboratorio, es decir, donde la composición no se administra para fines terapéuticos. En particular, la composición de la invención y como se describe en la presente memoria se puede reutilizar entre 2 y 30 veces, particularmente entre 5 y 30 veces, particularmente entre 10 y 30 veces, particularmente entre 15 y 30 veces, particularmente entre 20 y 30 veces, particularmente entre 25 y 30 veces, particularmente al menos 30 veces. Aquí, la "capacidad de recuperación aumentada" dependerá tanto de la recuperación mecánica de la composición como de la prevención del daño a la
 35 composición después del proceso real, pero generalmente se puede esperar que sea al menos 2 veces sin pérdida significativa si se observa una adaptación adecuada a un proceso industrial.

40 La presente invención se refiere además, en una realización particular, a una composición de la invención como se describe en la presente memoria, en donde dicha composición comprende además opcionalmente al menos una molécula seleccionada de los grupos de moléculas adaptadoras, moléculas de anclaje, moléculas de andamiaje y/o moléculas receptoras. Cualquiera de estas moléculas se puede utilizar para unir, estabilizar, capturar, atrapar o captar una molécula de sustrato (diana). Esto permite llevar el sustrato o la pareja de interacción más próxima al constituyente funcional, es decir, la proteína o el compuesto de tipo proteína, particularmente la enzima o compuesto de tipo enzima, y facilitar así la interacción de la proteína o compuesto de tipo proteína y su sustrato o pareja de interacción.

45 En una realización, la presente invención se refiere a la composición como se describe en la presente memoria, en donde la proteína o compuesto de tipo proteína y/o al menos una de las moléculas opcionales está unida covalentemente a la superficie del portador sólido. La proteína o compuesto del tipo de proteico y/o al menos una de las moléculas opcionales se pueden unir a la superficie del portador sólido mediante un grupo reactivo, proporcionado sobre la superficie del portador tal como, por ejemplo, un reticulante bifuncional, en particular glutaraldehído.

50 La composición según la presente invención se puede utilizar para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno en una muestra de un sujeto que se va a ensayar, en donde la proteína o compuesto de tipo proteína inmovilizado sobre la superficie del portador es una molécula de captura, que se une a una pareja de interacción específica, en donde la presencia o ausencia de dicha pareja de interacción específica indica si dicho sujeto padece de la enfermedad. Un ejemplo de una molécula de captura adecuada es un anticuerpo específico o partes funcionalmente equivalentes del mismo.

55 Además, la composición según la presente invención se puede utilizar para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno en una muestra de un sujeto que se va a ensayar, en donde la proteína o compuesto de tipo proteína inmovilizado sobre la superficie del portador es una enzima, en donde la enzima cataliza una reacción, que si tiene lugar indica la presencia de una molécula particular en dicha muestra, en particular la enzima cataliza la reacción entre

al menos dos moléculas, en donde al menos una de las moléculas se deriva de dicha muestra. Por ejemplo, una reacción positiva puede ser un cambio en el color de una disolución o la precipitación de una molécula, por tanto, la formación de un sólido en una disolución.

5 Un método para el diagnóstico de enfermedades o trastornos o una cierta condición médica en un sujeto que se va a ensayar puede comprender las siguientes etapas:

- a) obtener una muestra de dicho sujeto;
- b) obtener una muestra de un sujeto sano como control negativo de referencia;
- c) obtener una muestra de un sujeto que padece esta enfermedad como control positivo de referencia;
- 10 d) determinar las cantidades de una molécula particular presente en cada una de las muestras obtenidas en las etapas a) a c);
- e) comparar las cantidades de dicha molécula presentes en cada una de las muestras obtenidas en la etapa d);

Descripción de las figuras

Figura 1A) Vista esquemática del proceso para la producción de una enzima protegida sobre un material portador sólido;

- 15 a) la enzima se une sobre un material portador sólido;
- b) una capa protectora crece alrededor del catalizador inmovilizado;
- c) con el tiempo, la capa protectora puede rodear completamente la enzima.

Figura 1B) Representación esquemática de la estrategia de protección de la enzima;

- a: inmovilización de la enzima (forma circular) sobre el soporte de sílice sólido (negro);
- 20 b: autoensamblaje de los bloques de construcción de la capa de protección alrededor de la enzima, c y d: crecimiento de la capa de protección (gris).

Figura 2A) Micrografía SEM de las nanopartículas de sílice (SNPs) utilizadas como material portador.

Figura 2B) Micrografías SEM de las SNPs inmovilizadas con enzimas.

después de 4(izquierda),
6 (medio)
y 20 horas

de crecimiento de la capa protectora

25 Figura 3: Espesor de la capa protectora medido después de 4, 6 y 20 horas de reacción.

Figura 4: Actividades relativas de enzimas estresadas por calor a 42°C durante períodos de tiempo crecientes; libres (cuadrados negros)

30 y protegidas (cuadrados blancos) (los valores de actividad están normalizados con los valores de actividad iniciales medidos sin estrés por calor).

Figura 5: Actividades relativas de enzimas medidas a temperaturas de reacción crecientes.

35 libres (cuadrados negros) y

protegidas (cuadrados blancos)

Figura 6: Actividades relativas de enzimas incubadas a diferentes valores de pH y medidas a pH 6.5;

5 libres (barras blancas)

y

protegidas (barras negras)

(Los valores de actividad están normalizados con los valores de actividad iniciales.)

10 Figura 7: Actividades relativas de enzimas medidas a diferentes valores de pH; libres (cuadrados vacíos)

y

protegidas (cuadrados completos)

15 (los valores de actividad están normalizados con la actividad máxima observada a pH 6,5)

Figura 8: Actividad enzimática relativa

durante el crecimiento de la capa de silano;

(los valores de actividad están normalizados con la actividad del catalizador inmovilizado en la ausencia de capa protectora).

20 Figura 9: Actividad enzimática relativa de la enzima protegida (cuadrados negros)

y

libre de referencia (cuadrados vacíos)

al aumentar las duraciones del estrés por calor (65°C);

25 (los valores de actividad están normalizados con la actividad del catalizador inmovilizado antes del estrés por temperatura)

Figura 10: Espesor de la capa protectora medido a tiempos de reacción crecientes para otro ejemplo según la invención

Figura 11: Actividades relativas de

30 lactasa libre

y

lactasa protegida

con una capa hecha de mezcla de APTES-TEOS o

con una capa hecha de mezcla de silanos

35 estresada por calor a 50°C durante una hora.

Según la Figura 1A) que muestra una vista esquemática del proceso para la producción de una enzima protegida sobre un material portador sólido, la enzima se une primero sobre un material portador sólido (compárese la etapa a)). Luego, una capa protectora crece alrededor del catalizador inmovilizado (compárese la etapa b)). A partir de ahí, con el tiempo, la capa protectora puede rodear completamente la enzima (compárese la etapa c)).

Luego, la Figura 1B) muestra una representación esquemática de la estrategia de protección de la enzima. Primero, la inmovilización de la enzima (forma circular) sobre el soporte de sílice sólido (negro, compárese la etapa a)).

Luego, tiene lugar el autoensamblaje de los bloques de construcción de la capa de protección alrededor de la enzima.

5 Luego, compárese las etapas c y d, la capa de protección crece (gris). El entorno alrededor de la enzima (es decir, las interacciones entre la superficie externa de la enzima y las cavidades formadas en la capa de organosilice) proporciona un gran efecto de estabilización conformacional. En este ejemplo, el material portador es sílice (nanopartícula), y la capa protectora es organosilice (polisilsesquioxano) producida por la reacción de policondensación de precursores de sílice (tetraortosilicato y organosilanos).

10 Se observa que la estabilización aumentada de la estructura de la proteína terciaria contra el estrés alcanzado se concluye a partir de las mediciones de la actividad, ya que es probable que sea activa solo una enzima adecuadamente plegada.

En la Figura 2A) se muestran las micrografías SEM de las nanopartículas de sílice (SNPs) utilizadas como material portador, y las micrografías SEM de las SNPs inmovilizadas con enzimas después de 4 (izquierda), 6 (centro) y 20 horas de crecimiento de la capa protectora se muestran en la Fig. 2B).

15 Ejemplos

Ejemplo 1: Inmovilización de lactasa sobre un material portador sólido y protección mediante una capa de organosilice (es decir, silsesquioxano)

La inmovilización de la lactasa/ β -galactosidasa (EC. 3.2.1.23) sobre un material portador sólido tal como las nanopartículas de sílice (SNPs) y la protección implica cuatro etapas principales que son:

- 20 i. Modificación de la superficie de las SNPs para introducir puntos de anclaje (es decir, amina) para el acoplamiento químico adicional con la enzima.
- ii. Reacción química de los restos amina introducidos con un reticulador bifuncional (p. ej., glutaraldehído)
- iii. Acoplamiento de la enzima en la superficie de las SNPs a través de las funciones activas libres del reticulador bifuncional
- 25 iv. Policondensación de los bloques de construcción de silano alrededor tanto de las enzimas inmovilizadas como de la superficie libre de las SNPs para producir una capa protectora.

Este procedimiento sintético permite producir una capa protectora en la superficie de las SNPs que rodean y, por lo tanto, protegen la enzima. El espesor de la capa protectora producida se puede ajustar por diseño, dependiendo de la aplicación dirigida.

30 i) Las SNPs se produjeron utilizando el método convencional de Stöber adaptado del informe de Imhof et al. (J. Phys. Chem. B 1999, 103, 1408), como sigue. Se mezclaron etanol (345,4 ml), amoníaco al 25% (39,3 ml) y TEOS (tetraetilortosilicato, 15,3 ml) en un matraz de fondo redondo y esta mezcla se agitó a 600 rpm durante 20 horas, a una temperatura constante de 20°C. En consecuencia, el precipitado resultante se lavó dos veces con etanol y dos veces con agua, y se liofilizó para producir las SNPs descubiertas que se caracterizaron utilizando microscopía electrónica de barrido (Zeiss, SUPRA 40 VP). Se utilizaron las micrografías adquiridas para la medida del tamaño de partícula utilizando el paquete de software analysis® (Olympus) (análisis estadístico llevado a cabo en 100 mediciones). En la Fig. 2A se proporciona una micrografía representativa de las SNPs producidas.

35 ii) Para introducir en la superficie de las SNPs las funciones aminas que permitieron el anclaje adicional de la enzima que se va a proteger, se hicieron reaccionar con un aminosilano. Es importante observar que esta modificación debería ser solo parcial para dejar los grupos de silanol para una fijación adicional de la capa protectora.

En más detalles, se incubaron las SNPs en suspensión en agua (18 ml; 3,2 mg/ml) con APTES (3-aminopropiltriethoxisilano, 11 mg) durante 90 minutos a 20°C. Después de dos etapas de lavado en agua, las SNPs modificadas con amino resultantes se hicieron reaccionar durante 30 minutos con un reticulador bifuncional (para permitir la inmovilización adicional de la enzima), glutaraldehído, a una concentración final de 1g/l.

45 iii) Después de dos etapas de lavado en agua, se resuspendieron las SNPs resultantes en un tampón MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico) (pH 6,2, 1mM, 5mM MgCl₂) y se incubaron durante 1 hora a 20°C con la enzima, lactasa, (100 µg/ml) en agitación magnética a 400 rpm.

50 iv) La protección de la enzima inmovilizada sobre las SNPs se llevó a cabo incubando las SNPs inmovilizadas con las enzimas producidas con una mezcla de los bloques de construcción de silano que se autoensamblaron alrededor de la enzima y experimentaron una reacción de policondensación que creó una capa protectora alrededor de la enzima. Los bloques de construcción adecuados deben seleccionarse en función de la proteína o compuesto de tipo proteína de interés y sus residuos de aminoácidos sobre la superficie. Ejemplos de una selección preferida de

bloques de construcción autoensamblables se proporcionan en la TABLA 1, que proporciona una lista de los bloques de construcción de la supuesta capa protectora y las fuerzas principales, que interactúan entre los residuos de aminoácidos de la proteína de la superficie de la proteína protegida y los bloques de construcción autoensamblados. La reacción de policondensación también se produjo en la superficie descubierta de las SNPs permitiendo la unión de esta capa a la superficie de las SNPs. Con ese fin, se hicieron reaccionar las SNPs inmovilizadas con enzimas (18 ml; 3,2 mg/ml) primero a 20°C en agitación a 400 rpm con 36µl de TEOS. Después de 2 horas de reacción, se añadieron 18 µl de APTES y se dejó crecer la capa protectora con el tiempo a 4°C. Se recogieron muestras de las SNPs cada 2 horas y la reacción se detuvo después de 20 horas mediante dos etapas de lavado en tampón MES. Se midió como se describió anteriormente el espesor de la capa protectora de silano en diferentes momentos y se describe en la Fig. 2B y la Fig. 3. A partir de estos resultados, se pudo ver que la capa de organosilano tiene un espesor de 2, 10 y 25 nm después de 4, 6 y 20 horas de reacción respectivamente. Estos resultados confirmaron la posibilidad de controlar el crecimiento de la capa de organosilice en la superficie de las SNPs inmovilizadas con enzimas.

Se ensayó la actividad enzimática de las partículas así producidas utilizando orto-nitrofenil-β-galactósido (ONPG, en inglés ortho-nitrophenyl-β-galactoside) como sustrato artificial y siguiendo espectrofotométricamente la aparición del producto orto-nitrofenol (ONP) a 420 nm revelada en condiciones alcalinas. En más detalles, se recogieron las SNPs a duraciones crecientes de policondensación de silano y se lavaron dos veces en tampón MES. Para medir la actividad de la lactasa, se incubaron las SNPs durante 5 minutos a 40°C con ONPG (40 mM) a pH 6,5 y la reacción se detuvo mediante la adición de un volumen igual de una disolución acuosa de Na₂CO₃ (1M). El resultado mostró que el 45% de la actividad enzimática inicial estaba presente en las partículas que poseían una capa protectora de 25 nm, lo que confirma que incluso cuando la enzima está enterrada en una capa protectora de organosilice, mantiene parcialmente su actividad.

Con respecto a la Fig. 3, se observa que el espesor de la capa obtenido con el tiempo depende de la cinética de la reacción de policondensación y, correspondientemente, dependerá del (i) tiempo, (ii) temperatura y (iii) mezcla de organosilanos utilizados. Para (i) está claro que cuanto más tiempo se mantenga la reacción, más gruesa será la capa protectora. Para la temperatura, se entenderá que cuanto más alta sea la temperatura, más rápida será la cinética y, por lo tanto, más gruesa será la capa protectora (y viceversa). Con respecto a la mezcla de monómeros, se observa que la presencia de organosilanos con carácter básico (APTES o UPTES) reforzará el crecimiento de la capa protectora.

En la Fig. 3, se puede observar un retraso inicial que actualmente se atribuye a una prehidrólisis inicial y solubilización de los monómeros más hidrófobos. Una vez que se realizan estas reacciones iniciales, el espesor de la capa protectora se puede medir (p. ej., mediante el escaneo de micrografías electrónicas y el análisis estadístico del tamaño de partícula con un software). Si la capa protectora ha alcanzado el espesor necesario y la reacción y por lo tanto, el aumento de espesor adicional de la capa protectora se detendrá, esto se puede hacer en el caso de una reacción de policondensación que construye una capa protectora lavando las partículas y eliminando los monómeros sin reaccionar.

Tabla 1: Lista de bloques de construcción de la capa de protección y principales fuerzas que interactúan entre estos bloques de construcción y los residuos de aminoácidos sobre la superficie de la proteína o compuesto de tipo proteína de interés, que está embebido en la capa protectora. La selección de los bloques de construcción adecuados debería adaptarse a los residuos de aminoácidos de la superficie de la proteína presente.

Bloque de construcción de la capa de protección	Aminoácidos de la superficie de la proteína (código de 3 letras)	Principales interacciones involucradas
Benciltrietoxisilano	Phe, Tyr, Trp	interacciones p-p (aromáticas)
Propiltrimetoxisilano	Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Pro	Van der Waals
Isobutiltrietoxisilano	Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Pro	Van der Waals
n-octiltrietoxisilano	Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Pro	Van der Waals
Hidroximetiltrietoxisilano	Ser, Thr, Asp, Glu, Asn, Gln, Tyr	Enlacés de H
Bis(2-hidroxietil)-3-aminopropiltrietoxisilano	Ser, Thr, Asp, Glu, Asn, Gln, Tyr	Enlaces de H

Aminopropiltriethoxisilano	Asp, Glu	Iónico
Tetraortosilicato	Lys, Arg, His	Iónico
Carboxietilsilanetriol	Lys, Arg, His	Iónico

Con respecto a la Tabla 1, se observa lo siguiente: Primero, mientras se proporciona la Tabla 1 en relación con la imbibición de un constituyente funcional específico, se entenderá que la información descrita mediante la Tabla 1 y en relación con la misma será también relevante para otros constituyentes funcionales. Entonces, el experto medio en la técnica entenderá que la lista de la Tabla 1 no es exhaustiva y que existen otros monómeros de organosilano que se pueden utilizar para el método según la invención.

En este contexto, se observa además que la lista no es exhaustiva, ya que sería difícil establecer una exhaustiva, p. ej., ya que también se podrían producir y utilizar silanos no comerciales. Además, en ciertas ocasiones, puede ser ventajoso utilizar organosilanos que llevan grupos grandes y voluminosos, p. ej., octadeciltrimetoxisilano y trifeniltriethoxisilano, p. ej., para obtener poros suficientemente grandes.

Además, se observará que los silanos en la tabla, así como con frecuencia durante otras partes de la descripción, se proporcionan como derivados de triethoxi; sin embargo, se ha hecho referencia a un derivado único en lugar de a todos los derivados posibles, tal como p. ej. los derivados trimethoxi o trihydroxiethoxi, se ha hecho para simplificar la lectura y al mismo tiempo dirigir al lector a los organosilanos fácilmente disponibles, no para restringir el alcance de la descripción. El experto medio en la técnica entenderá que se podría tener que hacer referencia a "silanos" en general (p. ej., aminopropilsilano en lugar de referirse al aminopropiltriethoxisilano en la tabla). Además, la lista incluso no está completa con respecto a los silanos particularmente relevantes para las interacciones principales específicas. Como un ejemplo, el uridopropiltriethoxisilano y el (N-acetilglicil)-3-aminopropiltrimethoxisilano, podrían incluirse además como monómeros aceptores de donantes con enlaces de H fuertes.

Luego, se observa que CYS y MET no están enumerados en la Tabla 1. Sin embargo, si estos están presentes en la superficie del constituyente funcional, es posible seleccionar los organosilanos apropiados que interactúan con estos aminoácidos. Por ejemplo, se puede hacer uso del hecho de que estos aminoácidos pueden formar puentes de disulfuro covalente (-S-S-) a organosilanos adecuados que contienen un grupo -SH, tal como el (3-mercaptopropil)trimethoxisilano o, de una manera más genérica (3-mercaptopropil)silano. Por tanto, p. ej., los organosilanos que contienen un grupo funcional -SH también podrían añadirse a la lista.

Finalmente, será obvio que no solo se hará referencia la Tabla 1 con respecto a la encapsulación de la inmovilización de lactasa, sino que será encontrada también instructiva por el experto medio en la técnica que pretenda embebe otros constituyentes funcionales,

Ejemplo 2: Protección contra el estrés térmico.

La resistencia térmica de las enzimas protegidas con el método descrito en la presente memoria se ensayó utilizando partículas modificadas con lactasa con una capa protectora de 20 nm, producida como se describe en el Ejemplo 1. Las actividades catalíticas se midieron utilizando el método colorimétrico ONPG también descrito en el Ejemplo 1.

Primero las enzimas protegidas y libres se estresaron térmicamente a 42°C durante períodos de tiempo crecientes y se midió la actividad; véase Fig. 4.

Se pudo observar que, mientras la actividad de las enzimas libres se redujo al 70% después de 5min, 45% después de 30 min y 8% después de 60 minutos; la enzima protegida permaneció para todas las condiciones ensayadas a valores de actividad superiores al 90%. Curiosamente, la actividad incluso aumentó al 112% durante 20 minutos y 30 minutos de estrés por calor. Este conjunto de resultados demostró claramente la ventaja de la estrategia de protección de la enzima descrita en la presente memoria.

Además, la actividad de la enzima se midió a valores de temperatura crecientes; los resultados se describen en la Fig. 5.

De los resultados descritos en la Figura 5, se pudo ver que la actividad de la enzima libre se redujo a un valor del 52% a 50°C, y no se pudo medir la actividad a 50, 55 y 60°C. Para la enzima protegida, curiosamente, la actividad aumentó al 106%, 113% y 111% para temperaturas de reacción de 45°C, 50°C y 55°C. Se observa una ligera disminución del 11% para la reacción medida a 60°C.

Ejemplo 3: Resistencia al pH y ampliación del intervalo de pH de las lactasas protegidas

Se ensayó la resistencia de las enzimas protegidas con el método descrito en la presente memoria y la ampliación de su intervalo de actividad de pH utilizando partículas modificadas con lactasa con una capa protectora de 20 nm;

producida como se describe en el ejemplo 1. Se midieron las actividades catalíticas utilizando el método colorimétrico ONPG también descrito en el ejemplo 1.

5 Primero, se incubaron las enzimas libres e inmovilizadas durante 15 minutos a diferentes valores de pH (4,8, 6,5, 7,6, 8,8); el valor del pH se ajustó después al pH catalítico óptimo (6,5) y se midió la actividad de los diferentes sistemas; los resultados se describen en la Fig. 6. Se pudo ver que mientras el tratamiento a pH 6,5 no afectó ni a la enzima inmovilizada ni a su duplicado libre, un tratamiento a pH 4,8 causó una disminución drástica en la actividad de la enzima libre hasta el 25%, mientras que la enzima protegida no se vio afectada. A valores de pH de 7,6 y 8,8, la enzima libre perdió el 15% y 28% de actividad respectivamente, mientras que la enzima protegida no se vio afectada a pH 7,6 y perdió solo el 10% de actividad a pH 8,8.

10 Además, se midieron las actividades catalíticas de las lactasas libres e inmovilizadas utilizando el método colorimétrico ONPG descrito en el ejemplo 1 a diferentes valores de pH (5,5, 6,0, 6,5, 7,5 y 8,0). Los valores de actividad relativa medidos se describen en la figura 7.

15 Ambos sistemas enzimáticos tenían un valor de pH óptimo de 6,5. Al aumentar el pH a 7,5 y 8,0, la enzima libre mostró una disminución en la actividad del 20% y 40% respectivamente, mientras que la enzima protegida perdió solo el 5% y el 18% en las mismas condiciones. Para los valores de pH ácido, la enzima libre perdió el 40% y 80% de actividad para un valor de pH de 6,0 y 5,5, respectivamente; mientras que la enzima protegida perdió solo el 2% y el 15%. Esos resultados confirmaron la protección de la enzima que dió como resultado la ampliación de su intervalo de actividad.

Ejemplo 4: Protección contra el ataque de proteasa

20 Se ensayó la resistencia a las proteasas de las enzimas protegidas con el método descrito en la presente memoria utilizando partículas modificadas con lactasa con una capa protectora de 20 nm, producida como se describe en el ejemplo 1. Se incubaron las enzimas libres y protegidas con proteinasa K y tripsina (1 mg/ml) durante 60 min a 37°C en Tris-HCl 0,1M (pH 7,4). Mientras que la actividad de la enzima libre se redujo a cero, la actividad de la enzima protegida permaneció sin cambios.

25 Ejemplo 5: Inmovilización de fosfatasa ácida sobre las SNPs y protección mediante una capa de organosílice (es decir, silsesquioxano) y ensayo de estrés por temperatura.

30 La inmovilización de fosfatasa ácida (EC. 3.1.3.2) sobre las SNPs y la protección mediante el crecimiento de una capa de organosilanos se han realizado como se describe en el ejemplo 1. Se produjeron y se ensayaron los catalizadores protegidos, con espesores crecientes de la capa de protección, utilizando para-nitrofenilfosfato (pNPP, en inglés. para-nitrophenylphosphate) como sustrato artificial. Se siguió espectrofotométricamente la aparición del producto p-nitrofenol (pNP) a 405 nm y se reveló en condiciones alcalinas.

Brevemente, para medir la actividad de la fosfatasa ácida, se incubaron los biocatalizadores protegidos durante 5 minutos a 37°C con pNPP (15 mM) a pH 4,8 y la reacción se detuvo mediante la adición de un volumen igual de una disolución acuosa de NaOH (100 mM); los resultados se proporcionan en la Figura 8. Se muestra que la actividad enzimática aumenta con la presencia de la capa protectora.

35 Se ensayó la resistencia a la temperatura incubando las partículas producidas (y la enzima de referencia soluble) a 65°C para aumentar las duraciones. Los resultados de la actividad se describen en la Figura 9. Se demuestra que mientras la enzima de referencia libre perdió más del 90% de actividad después de 10 minutos y más del 95% después de 30 minutos, la enzima protegida mantiene tanto como un 80% después de 10 minutos de tratamiento y más del 75% después de 60 minutos.

40 Ejemplo 6: Inmovilización de lactasa sobre las SNPs y protección mediante una capa hecha de una mezcla de silanos

Se ha realizado la inmovilización de lactasa/ β -galactosidasa (EC. 3.2.1.23) sobre las SNPs como se describe en el ejemplo 1. La protección de la enzima inmovilizada sobre las SNPs se llevó a cabo incubando las SNPs inmovilizadas con enzimas producidas con una mezcla de bloques de construcción de silano que se autoensamblaron alrededor de la enzima y experimentaron una reacción de policondensación que creó una capa protectora alrededor de la enzima. Los silanos utilizados fueron: APTES, TEOS, benciltrietoxisilano (BTES), propiltrimetoxisilano (PTES) e hidroximetiltriethoxisilano (HMTES). En más detalles, se hicieron reaccionar las SNP inmovilizadas con enzimas (18 ml; 3,2 mg/ml) primero a 20°C en agitación a 400 rpm con 36 μ l de TEOS. Después de 1 hora de reacción, se añadieron 18 μ l de APTES, 18 μ l de BTES, 18 μ l de PTES y 36 μ l de HMTES y se dejó crecer la capa protectora a 20°C. Se recogieron muestras de las SNPs a tiempos de reacción crecientes y la reacción se detuvo después de 20 horas mediante dos etapas de lavado en tampón MES. Se midió el espesor de la capa protectora de silano, en diferentes momentos, como se describió anteriormente. Como se muestra en la Fig. 10, la capa de organosilano tenía un espesor de 2, 8, 12 y 16 nm después de 4, 6, 10, 17 y 20 horas de reacción, respectivamente.

55 Se ensayó la resistencia térmica de la lactasa protegida así producida mediante incubación a 50°C durante 60 minutos y se comparó con el catalizador protegido utilizando una mezcla de APTES-TEOS como se muestra en la figura 5. El resultado mostró que, mientras la actividad de la lactasa libre fue inferior al 5% después de 1 hora de tratamiento a

50°C, la actividad de la lactasa protegida con una capa hecha de APTES-TEOS o hecha de una mezcla de silanos fue superior al 110% y 150% respectivamente (Figura 11).

Se observa que la presente invención reivindica la prioridad del documento EP 1317850.4. El documento que da prioridad está incluido completamente en la presente memoria para los objetos de la descripción.

5 Por consiguiente, lo que se ha descrito anteriormente, entre otras, es una composición que comprende al menos una proteína o compuesto de tipo proteína y, opcionalmente, que comprende además al menos una molécula seleccionada de los grupos de moléculas adaptadoras, moléculas de anclaje, moléculas de andamiaje y/o moléculas receptoras, inmovilizadas en la superficie de un portador sólido, en donde dicha proteína o compuesto de tipo proteína y la al menos una molécula opcional está total o parcialmente embebida en un material protector comprendido de bloques de construcción autoensamblables, cuyos bloques de construcción comprenden grupos funcionales, que interactúan con los grupos químicos de la proteína o compuesto de tipo proteína y la al menos una molécula opcional de tal manera que se establece un nanoentorno poroso sobre la superficie del portador y alrededor de la proteína o compuesto del tipo proteico inmovilizado y la al menos una molécula opcional que estabiliza la conformación nativa y preserva la función de la proteína o compuesto de tipo proteína y la al menos una molécula opcional.

15 Además, se ha sugerido que en tal composición el portador sólido es una nanopartícula, particularmente una nanopartícula de sílice (SNP), particularmente una nanopartícula de oro, particularmente una nanopartícula de titanio.

Además, se ha sugerido que en tal composición, la unión de la proteína o compuesto de tipo proteína a la superficie del portador sólido es la unión covalente.

20 Además, se ha sugerido que en tal composición, el tamaño de la nanopartícula está en un intervalo de entre 20 y 1000 nm, particularmente de entre 200 y 500 nm, particularmente entre 300 y 400 nm.

Además, se ha sugerido que en tal composición, el espesor del material protector oscila de 1 a 100 nm, 1nm a 50 nm, 1nm a 30 nm, 1nm a 25 nm, 1nm a 20 nm, 1nm a 15 nm, preferiblemente de 5nm a 15 nm.

25 Además, se ha sugerido que en tal composición, el material protector autoensamblado tiene un tamaño de poro que permite la difusión de sustratos, particularmente un tamaño de poro de entre 1nm y 10 nm, particularmente entre 2nm y 9nm, particularmente entre 3nm y 8nm, particularmente entre 4nm y 7nm, particularmente entre 4nm y 6nm, particularmente entre 4nm y 5nm.

30 Además, se ha sugerido que en tal composición, los grupos funcionales del material protector autoensamblado son grupos que interactúan con las cadenas laterales de aminoácidos de la proteína o compuesto de tipo proteína, en particular, basado en las interacciones de fuerza débil. Además, se ha sugerido que en dicha composición, dicho material protector es organosilice.

Además, se ha sugerido que dicha proteína o compuesto de tipo proteína es una enzima o compuesto de tipo enzima, particularmente una enzima o compuesto de tipo enzima, que se selecciona del grupo que consiste en oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isómerasas y/o ligasas.

35 Además, se ha sugerido que en tal composición, dicha proteína o compuesto del tipo proteico y/o al menos una de las moléculas opcionales está unida a la superficie del portador sólido mediante un reticulador bifuncional, particularmente un reticulador bifuncional seleccionado del grupo de glutaraldehído, disuccinimidil tartrato, bis[sulfosuccinimidil] suberato, etilenglicolbis(sulfosuccinimidilsuccinato), adipimidato de dimetilo, pimetilimidato de dimetilo, aminobenzoato de sulfosuccinimidil(4-yodoacetilo), 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno, sulfhidrilos activados (p. ej., 2-piridilditio reactivo con sulfhidrilo).

40 Además, se ha sugerido que en tal composición, el material protector proporciona protección para:

a) un pH, diferente del pH óptimo de la al menos una proteína o compuesto de tipo proteína, en donde el valor del pH difiere del pH óptimo en un valor de +/-5, +/-4; +/-3, +/-2, +/-1, +/-0,5 unidades de pH; y/o

b) estrés químico; y/o

c) estrés biológico; y/o

45 d) disolventes; y/o

e) estrés físico; y/o

f) temperaturas elevadas, que exceden la temperatura óptima para la proteína o compuesto de tipo proteína desprotegido en 60°C, particularmente en 50°C, particularmente en 40°C, particularmente en 30°C, particularmente en 20°C, particularmente en 10°C, particularmente en 5°C; y/o

g) temperaturas reducidas, que se desvían de la temperatura óptima para la proteína o compuesto de tipo proteína desprotegido en 60°C, particularmente en 50°C, particularmente en 40°C, particularmente en 30°C, particularmente en 20°C, particularmente en 10°C, particularmente en 5°C.

Además, se ha sugerido que en tal composición, dicha enzima inmovilizada y protegida tiene:

- 5 a) una actividad aumentada en condiciones de estrés cuando se compara con la enzima libre desprotegida; y/o
- b) una capacidad de recuperación aumentada para uso en operación continua comparada con la enzima libre desprotegida.

Luego, se sugiere un método para producir tal composición que comprende las etapas de:

- a) obtener un portador sólido; e
- 10 b) inmovilizar al menos una proteína o compuesto de tipo proteína de interés, en particular, al menos una enzima o compuesto de tipo enzima, y, opcionalmente, al menos una molécula opcional en la superficie del portador; e
- c) incubar la al menos una proteína o compuesto de tipo proteína y, la molécula opcional unida a la superficie del portador sólido con bloques de construcción autoensamblables para producir un nanoentorno poroso alrededor de la superficie libre del portador sólido y la al menos una proteína y/o un compuesto de tipo proteína y una molécula
- 15 opcional unida a/en la superficie del portador sólido, y
- d) detener la reacción de autoensamblaje del material protector en un momento específico para obtener una capa protectora preferida con un espesor deseado.

Además, se ha sugerido que tal composición se utilice en un proceso catalítico. Además, se ha sugerido que tal

20 composición se utilice en terapia, por ejemplo, del síndrome de deficiencia de esfingomielinasa (ASMD), enfermedad de Niemann-Pick (NPD), enfermedades de almacenamiento lisosomal, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, MPS I, MPS II, MPS VI y enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II, cáncer, enfermedades alérgicas, enfermedades metabólicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunes, enfermedades del sistema nervioso, enfermedad linfática y enfermedad viral.

Referencias

1. C. Mateo et al., *Enzyme Microb. Technol*, 2007, 40, 1451
2. D. Brady and J. Jordaan, *Biotechnol Lett*, 2009, 31, 1639
3. R.C. Rodrigues et al., *Chem Soc Rev*, 2013 [Epub ahead of print]
- 5 4. H. R. Luckarift et al., *Nat Biotechnol*, 2004, 22, 211
5. U. Hanefeld et al., *Chem Soc Rev*, 2009, 38, 453
6. M. Hartmann and D. Jung, *J Mater Chem*, 2010, 20, 844
7. L. Hilterhaus et al., *Bioproc Biosyst Eng*, 2008, 31, 163
8. R. R. Naik et al., US2005095690; 2005
- 10 9. S.A. Werchant, WO2010039384; 2010
10. W. R. K. Schoevaart, US 20120149082A1; 2012
11. Ostaszewski et al., US 2010/0240116 A1; 2010
12. R. Bond et al., US 7642077B2, 2010
13. R. Bond et al., WO2005056808, 2006
- 15 14. S. J. Chung et al., US 2010/0196937A1, 2010
15. J.H. Chang et al., US 2012/0264188A1, 2012
- A. Auger et al., WO2011/058046A1, 2011
- A. Auger et al., US 2012/0283379A1, 2012
16. A Leech et al., WO 2011/060129 A1, 2011
- 20 17. N. J. Lant et al., WO 2013/003025, 2013
18. L.S. Wong et al., *Chem Rev*, 2009, 109, 4025
19. S. C. Esener et al., WO2012142625 A2, 2012
20. Q. Husain, *Crit Rev Biotechnol*, 2010, 30, 41
21. H. Hirohara et al., EP0026672A2, 1981
- 25 B. Giacomini et al., *J Mol Catal B-Enzym*, 1998, 4, 313
- A. Tanriseven and S. Dogan, *Process Biochem*, 2002, 38, 27
22. E.J. Mammarella and A.C. Rubiolo, *J Mol Catal B Enzym*. 2005, 34, 7
23. S. Rejikumar and S. Devi, *Int J Food Sci Technol*, 2001, 36, 91
- I. Roy and M. N. Gupta, *Process Biochem*, 2003, 39, 325
- 30 24. N. Albayrak and S.T. Yang, *Enz. Microb Technol*, 2002, 31, 371
25. N. Albayrak and S. T. Yang, *Biotechnol Prog*, 2002, 18, 240
- C. Mateo et al., *Biotechnol Prog*, 2004, 20, 1259
26. M. Ladero et al., *Enzyme Microb Tech*, 2000, 27, 583
27. L. Betancor et al., *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99, 261
- 35 28. Y. Kuwahara et al., *Chem Commun*, 2012, 48, 2882
29. Z. Grosova et al, *Biotechnol Lett*. 2008, 30, 763
30. D.F.M. Neri et al., *Catal Commun*, 2008, 9, 2334

31. J. Hotchkiss and J. N. Talbert, US 2010196985A1, 2010
32. WO 93/07263 A2 (GENENCOR INT [US]) 15 April 1993 (1993-04-15)
33. US 6 268 329 B1 (MARKUSSEN ERIK KJ AELIG R [DK]) 31 July 2001 (2001-07-31)
- 5 34. YONG-GINO XIA ET AL: "Protein recognition onto silica particles using chitosan as intermedium substrate", JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A, vol. 90A, no. 2, 1 August 2009 (2009-08-01), pages 326-332, XP055099686, ISSN: 1549-3296, DOI: 10.1002/jbm.a.32084
35. MATEO ET AL: "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques" ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, STONEHAM, MA, US, vol. 40, no. 6, 29 March 2007. (2007-03-29), pages 1451-1463, XP022003968, ISSN: 0141-0229, DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.01.018
- 10 36. ULF HANEFELD ET AL: "Understanding enzyme immobilization", CHEMICAL SOCIETY REVIEWS, vol. 38, no. 2, 1 January 2009 (2009-01-01), page 453, XP055099160, ISSN: 0306-0012, DOI: 10.1039/b711564b
37. DEAN BRADY ET AL: "Advances in enzyme immobilisation", BIOTECHNOLOGY LETTERS, SPRINGER NETHERLANDS, DORDRECHT, vol. 31, no. 11, 10 July 2009 (2009-07-10), pages 1639-1650, XPO19746235, ISSN: 1573-6776, DOI: 10.1007/S10529-009-0076-4
- 15 38. GALLIKER P ET AL: "Laccase-modified silica nanoparticles efficiently catalyze the transformation of phenolic Compounds", JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 349, no. 1, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 98-105, XP027113832, ISSN: 0021-9797 [retrieved on 2010-05-16]
- 20 39. CHIORCEA-PAQUIM A M ET AL: "AFM nanometer surface morphological study of in situ electropolymerized neutral red redox mediator oxysilane sol-gel encapsulated glucose oxidase electrochemical biosensors", BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 24, no. 2, 15 October 2008 (2008-10-15), pages 297-305, XP023439562, ISSN: 0956-5663, DOI: 10.1016/j.bios.2008.04.001 [retrieved on 2008-04-11]
40. WO 2005/056808 A2 (GENENCOR INT [US]; DOW CORNINGI [US]; BOND RISHA [US]; JEWETT MICHAEL C) 23 June 2005 (2005-06-23)
- 25 41. SANJIB BHATTACHARYYA ET AL: "Polymer-coated mesoporous silica nanoparticles for the controlled release of macromolecules", ACTA BIOMATERIALIA, vol. 8, no. 9, 1 September 2012 (2012-09-01), pages 3429-3435, XP055099688, ISSN: 1742-7061, DOI: 10.1016/j.actbio.2012.06.003

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una composición, la composición que comprende al menos un portador sólido, un constituyente funcional, seleccionado de una proteína y un compuesto de tipo proteína, en donde la proteína y el compuesto de tipo proteína es una enzima,
- 5 una capa protectora para proteger la enzima, mediante embebido de la enzima al menos parcialmente, y al menos un reticulador bifuncional para unir la enzima a la superficie del portador sólido, en donde el método comprende las etapas que,
- primero, la al menos una enzima se inmoviliza sobre la superficie del portador sólido,
- 10 y luego la capa protectora para proteger la enzima mediante embebido de la enzima al menos parcialmente, se construye con bloques de construcción, al menos parte de los cuales son monómeros capaces de interactuar entre sí y la enzima inmovilizada, en donde los bloques de construcción construyen la capa protectora mediante una policondensación de precursores de sílice en condiciones acuosas, en donde los precursores de sílice son trialcoxisilano y tetraalcoxisilano, y,
- 15 en donde el método comprende la etapa adicional de después de un intervalo de tiempo de reacción específico detener una reacción de autoensamblaje del material protector para construir la capa protectora con los bloques de construcción para así obtener una capa protectora preferida con un espesor deseado, en donde el espesor de la capa protectora oscila de 1 a 25 nm y está entre 50% y 150% de la longitud del eje más largo de la al menos una enzima.
2. Un método según la reivindicación 1, en donde la enzima inmovilizada y protegida tiene a) una actividad aumentada en condiciones de estrés cuando se compara con la enzima libre desprotegida; y/o b) una capacidad de recuperación aumentada para uso en operación continua cuando se compara con la enzima libre desprotegida.
- 20 3. Una composición que comprende un portador sólido, al menos un constituyente funcional, seleccionado de una proteína y un compuesto de tipo proteína, en donde la proteína y el compuesto de tipo proteína es una enzima,
- 25 al menos un reticulador bifuncional para unir la enzima a la superficie del portador sólido y en donde la enzima está inmovilizada sobre la superficie del portador sólido, y una capa protectora para proteger la enzima mediante al embebido de la enzima al menos parcialmente, en donde la capa protectora para proteger la enzima es una capa construida con bloques de construcción, monómeros de los que son capaces de interactuar entre sí y la enzima inmovilizada, en donde los bloques de construcción
- 30 construyen la capa protectora mediante una policondensación de precursores de sílice en condiciones acuosas, en donde los precursores de sílice son trialcoxisilano y tetraalcoxisilano, y en donde el espesor de la capa protectora oscila de 1 a 25 nm y está entre 50% y 150% de la longitud del eje más largo de la al menos una enzima.
4. La composición de la reivindicación 3, en donde la enzima inmovilizada y protegida tiene a) una actividad aumentada en condiciones de estrés cuando se compara con la enzima libre desprotegida; y/o b) una capacidad de recuperación aumentada para uso en operación continua cuando se compara con la enzima libre desprotegida.
- 35 5. La composición de la reivindicación 3, en donde el portador sólido es una nanopartícula, particularmente una nanopartícula seleccionada del grupo de nanopartícula orgánica, nanopartícula inorgánica, nanopartícula de material compuesto orgánico-inorgánico, nanopartícula orgánica de autoensamblaje, nanopartícula de sílice mesoporosa (SNP), nanopartícula de oro, nanopartícula de titanio.
- 40 6. La composición de la reivindicación 3 o 5, en donde el portador es un portador en forma de partículas, en particular con un tamaño de partícula de hasta 100 μm , preferiblemente en un intervalo entre 20 y 1000 nm, particularmente entre 200 y 500 nm, particularmente entre 300 y 400 nm.
7. La composición según una de las reivindicaciones 3-6, en donde el espesor de la capa protectora oscila de 1nm a 20 nm, 1nm a 15 nm, preferiblemente de 5nm a 15 nm.
- 45 8. La composición según una de las reivindicaciones 3-7, en donde dicha enzima, se selecciona del grupo que consiste en oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y/o ligasas.
9. El uso de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en un proceso catalítico.

- 5 10. El uso de la composición en un proceso catalítico de la reivindicación 9, en donde durante el proceso la composición se somete a al menos uno de un pH diferente del pH óptimo del constituyente funcional, en particular de tal manera que el valor de pH difiera al menos en +/-0,5 unidades de pH y/o hasta +/-5 unidades de pH desde el pH óptimo para el constituyente funcional y/o a los estrés químicos; y/o a los estrés biológicos; y/o a los disolventes; y/o al estrés físico; y/o a temperaturas elevadas, que exceden la temperatura óptima para el constituyente funcional en al menos 5°C; y/o hasta 60°C, particularmente en 50°C, particularmente en 40°C, particularmente en 30°C, particularmente en 20°C, particularmente en 10°C, particularmente en 5°C y/o a temperaturas reducidas, que se desvían de la temperatura óptima para el constituyente funcional en al menos 5°C; y/o hasta 60°C.
- 10 11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso en terapia, en particular terapia de uno de síndrome de deficiencia de esfingomielinasa (ASMD), enfermedad de Niemann-Pick (NPD), enfermedades de almacenamiento lisosomal, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, MPS I, MPS II, MPS VI enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II, cáncer, enfermedades alérgicas, enfermedades metabólicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunes, enfermedades del sistema nervioso, enfermedad linfática y enfermedad viral.

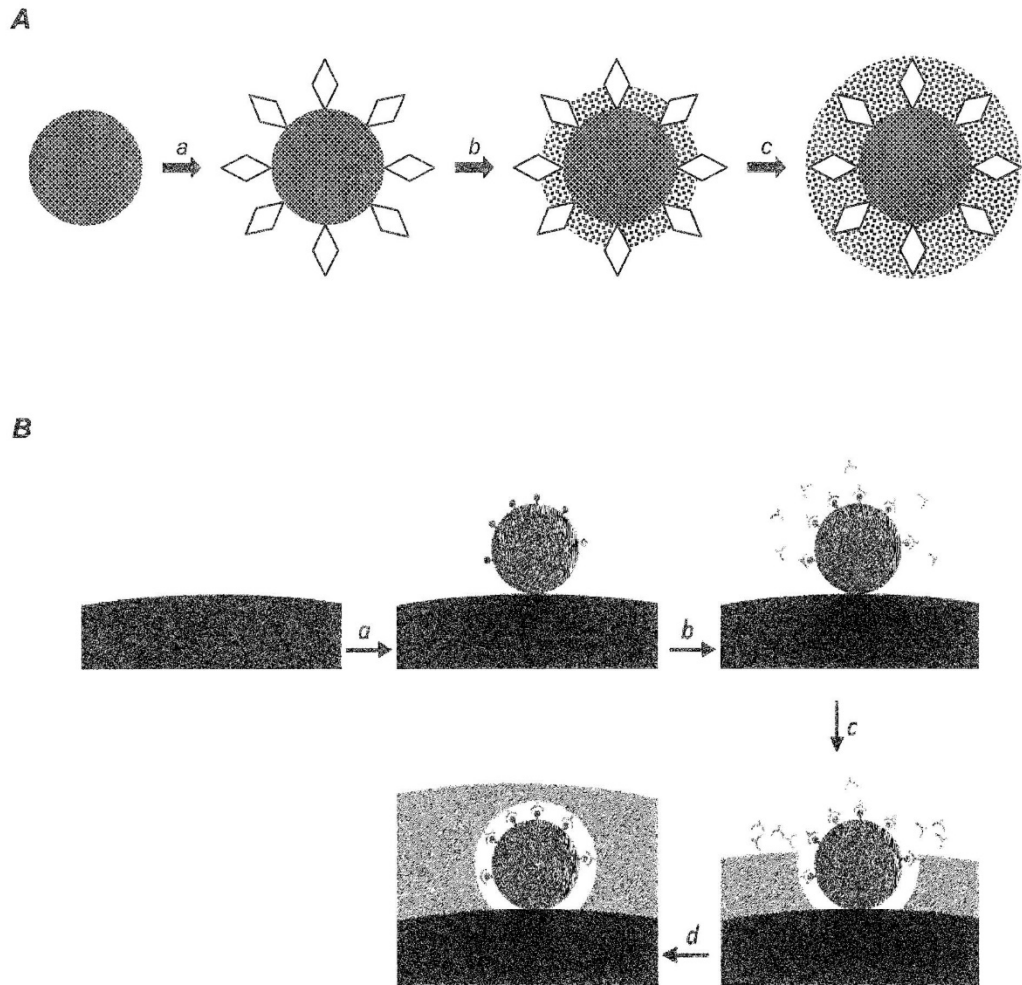
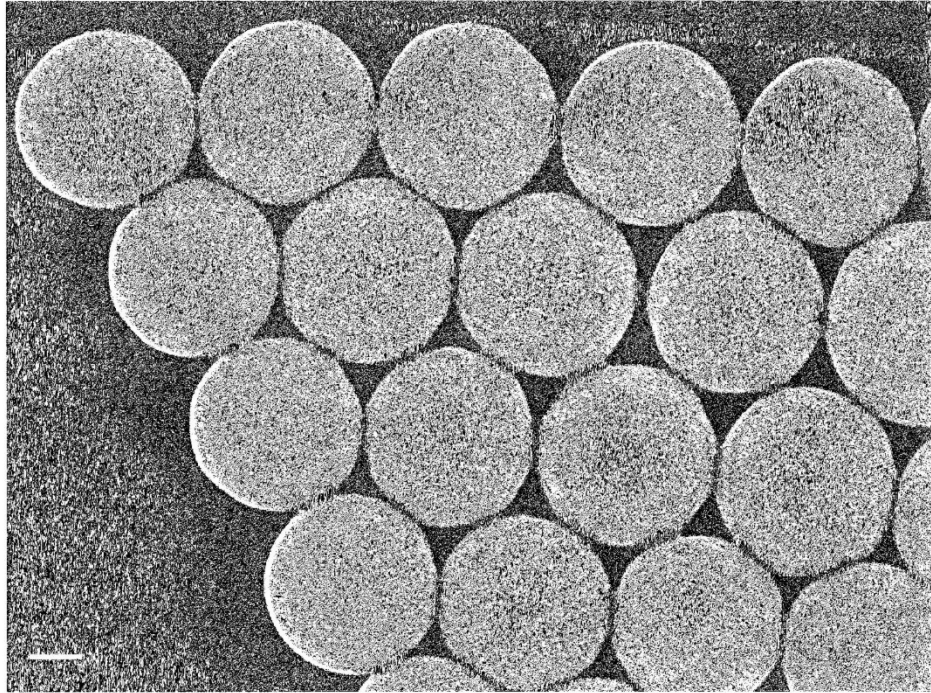


FIGURA 1 A + B

A



B

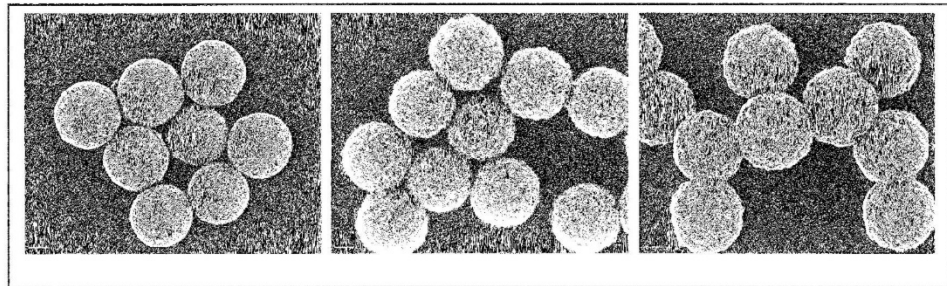


FIGURA 2 A + B

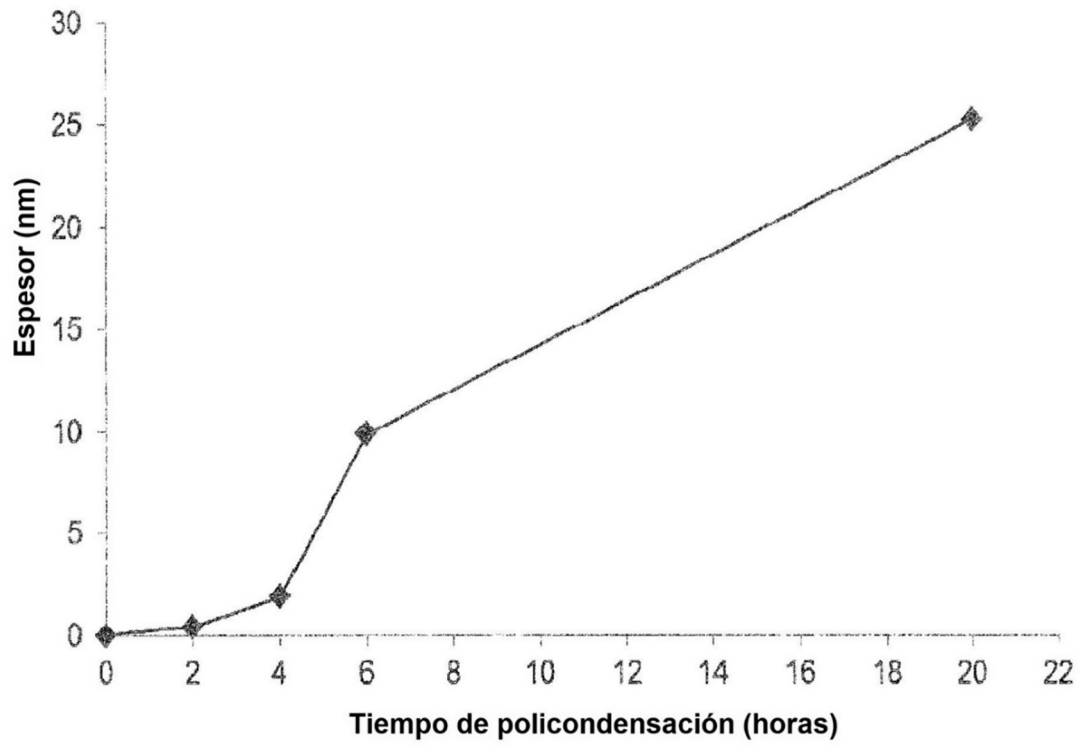


FIGURA 3

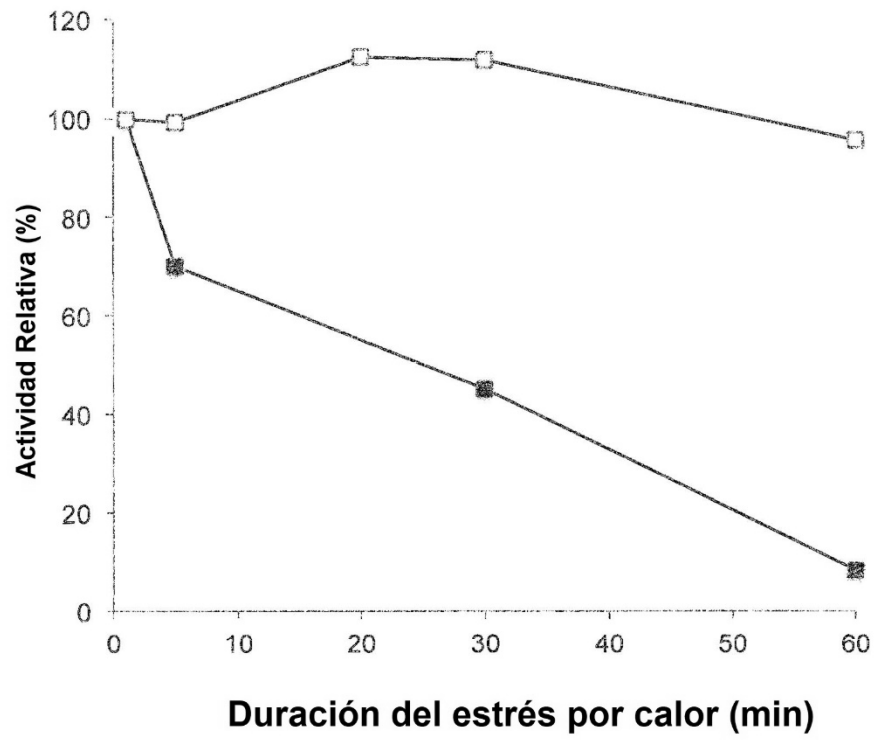


FIGURA 4

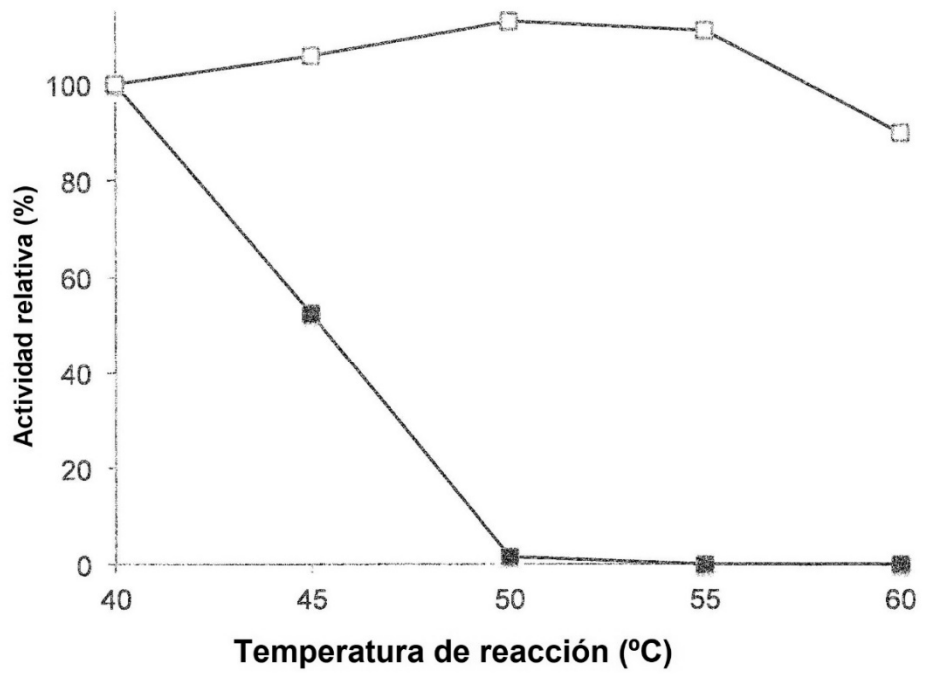


FIGURA 5

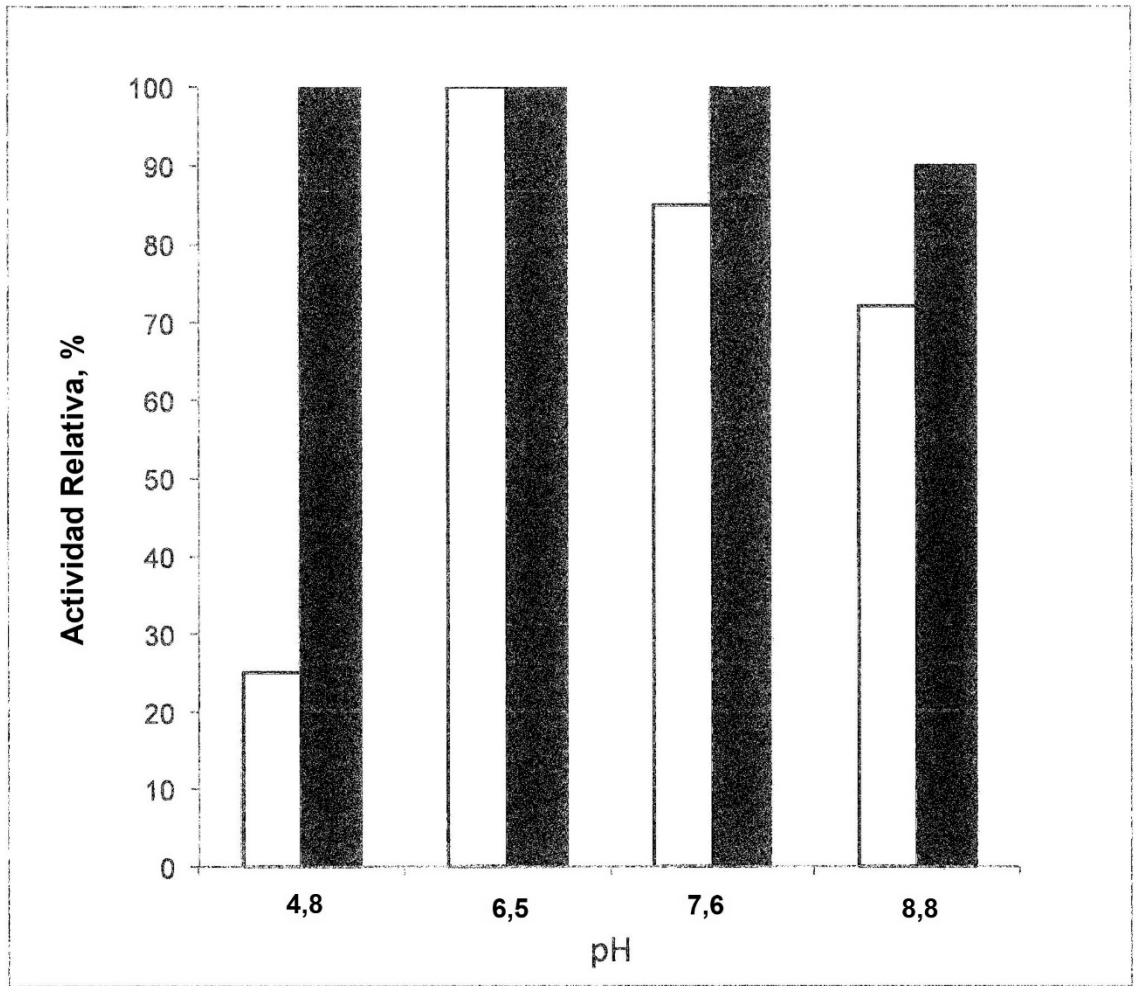


FIGURA 6

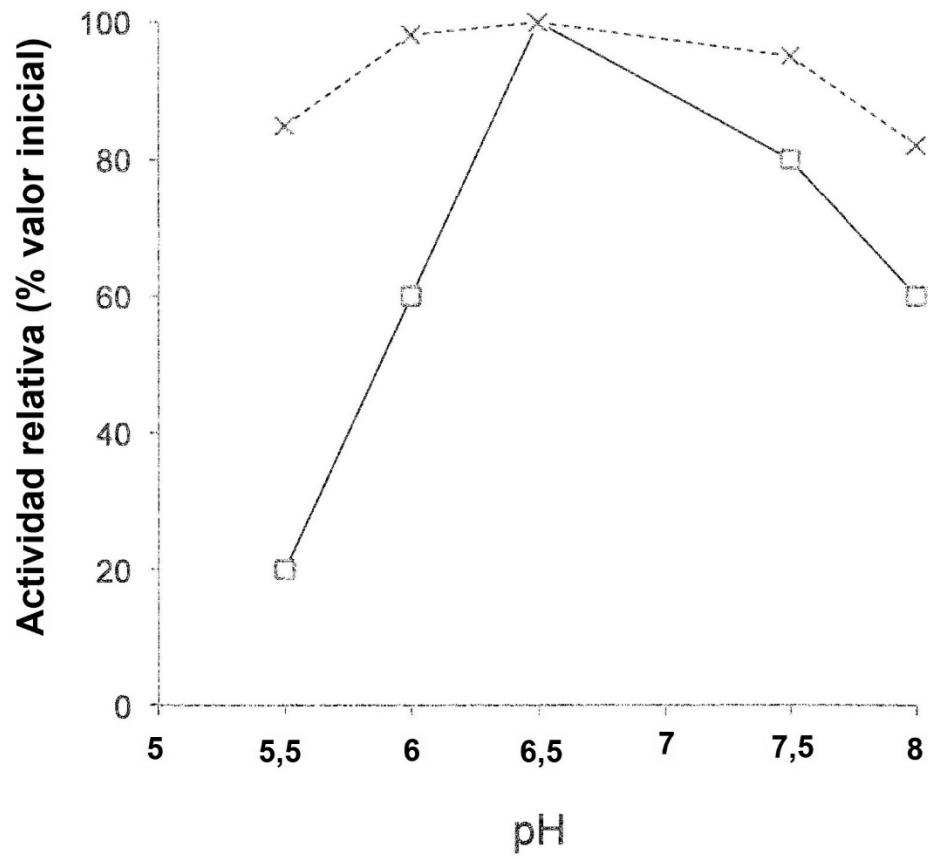


FIGURA 7

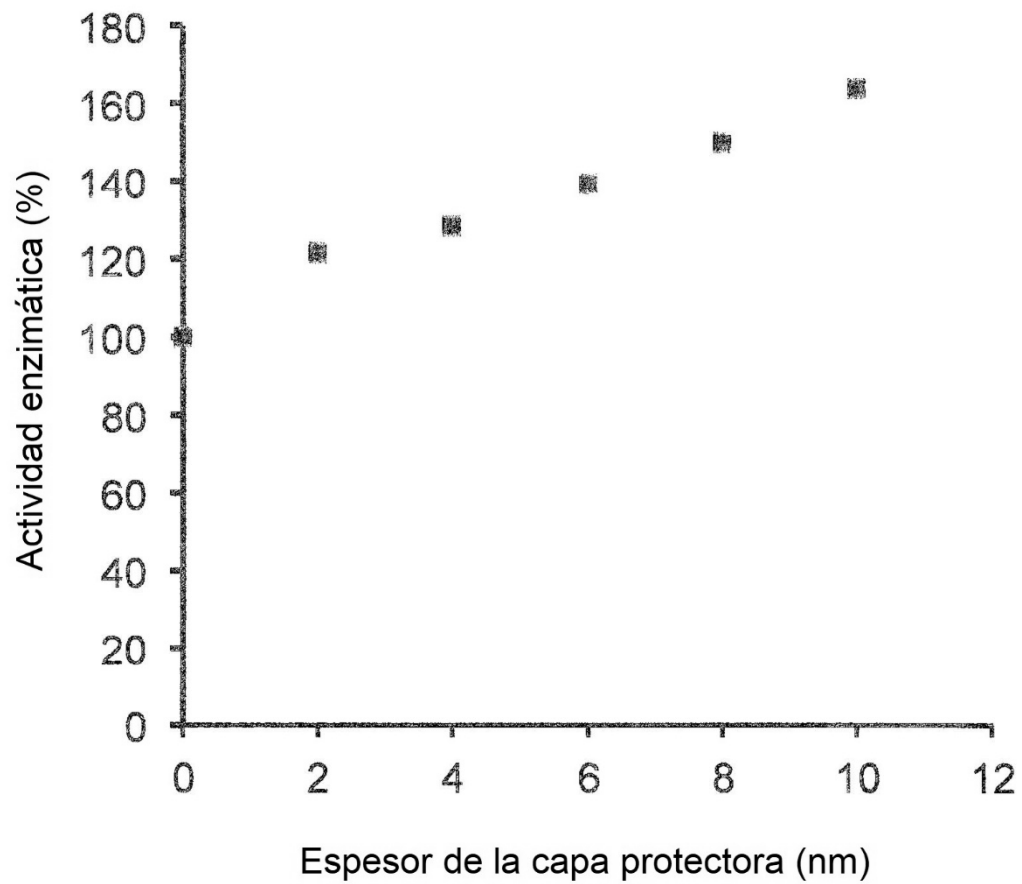


Figura 8: Actividad enzimática relativa durante el crecimiento de la capa de silano; los valores de actividad están normalizados con la actividad del catalizador inmovilizado en la ausencia de capa protectora.

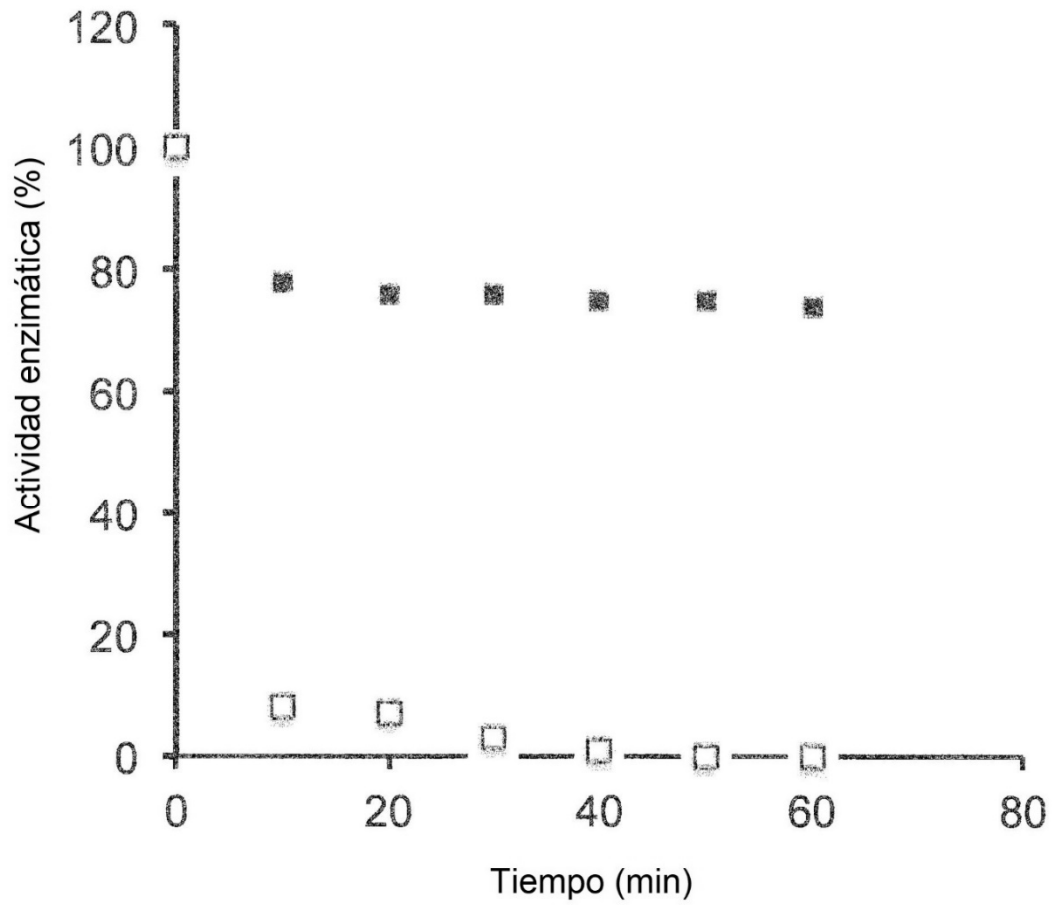


Figura 9: Actividad enzimática relativa de la enzima protegida (cuadros negros) y libre de referencia (cuadros vacíos) al aumentar las duraciones del estrés por calor (65°C); los valores de actividad están normalizados con la actividad del catalizador inmovilizado antes del estrés por temperatura.

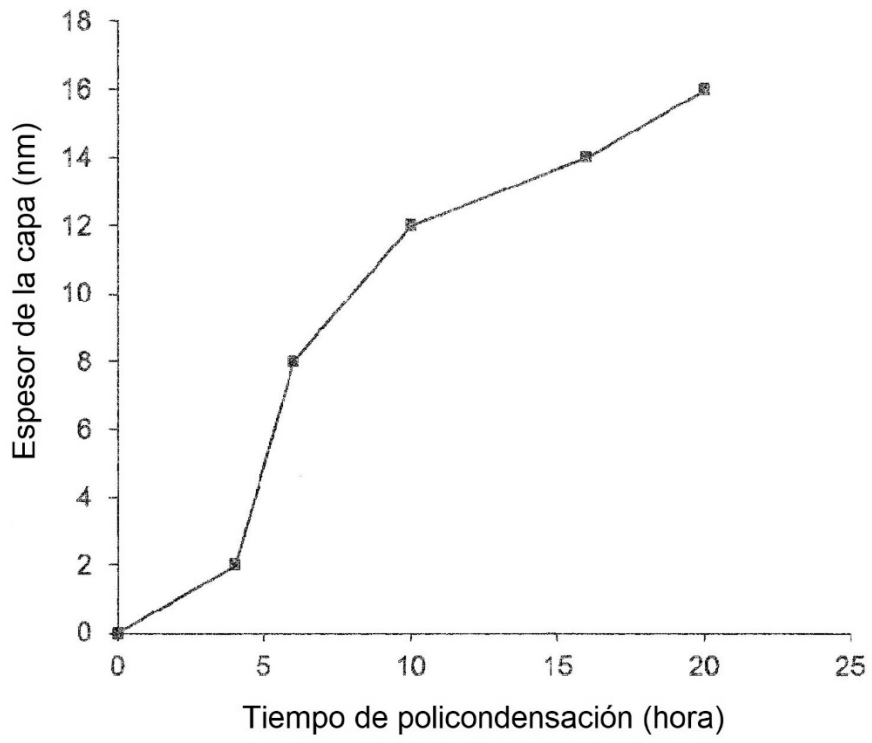


Figura 10: Espesor de la capa protectora medido a tiempos de reacción crecientes

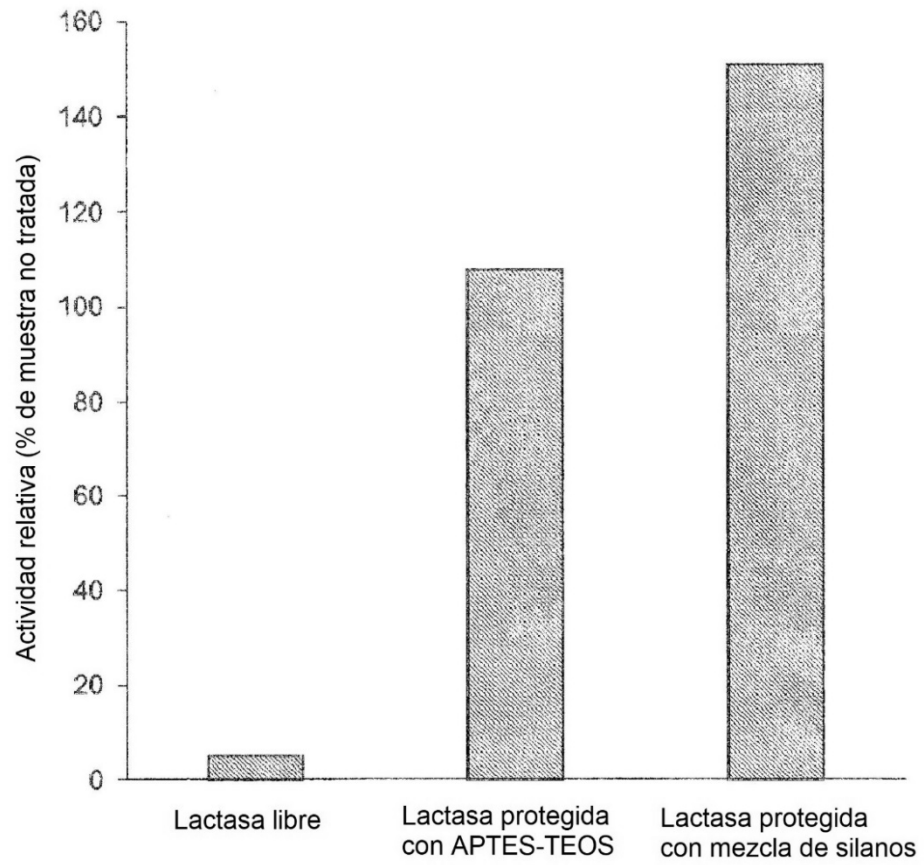


Figura 11: Actividades relativas de la lactasa libre y la lactasa protegida con una capa hecha de mezcla de APTES-TEOS o con una capa hecha de mezcla de silanos estresada por calor a 50°C durante 1 hora.