

## Trabajo de revisión

### Aplicación de los estudios de la estructura tridimensional de proteínas al diseño de nuevos medicamentos

A. DÍAZ

Unidad Analítica, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba.

Recibido en febrero de 1992

Aprobado en mayo de 1992

#### RESUMEN

Varios ejemplos de utilización de la estructura tridimensional de proteínas en el diseño de nuevos medicamentos son discutidos, entre ellos, la familia de las proteasas aspárticas. Se discuten los estudios de inhibición de las proteasas aspárticas en los problemas de la hipertensión y en la lucha contra el VIH.

#### SUMMARY

Some examples of three-dimensional structure of protein toward drug design are analyzed, specially the family of the aspartic proteinases. The studies made on renin and HIV protease inhibition are discussed.

#### INTRODUCCION

Históricamente el descubrimiento de nuevos medicamentos se ha basado en estrategias donde las moléculas "blancos" de dichos medicamentos eran "invisibles" en el sentido de que las interacciones ocurridas a nivel molecular eran desconocidas. En la mayoría de los casos el método utilizado era el de prueba y error. En otras ocasiones el descubrimiento fue casual, como ocurrió con la penicilina, o resultó derivado de la observación de la medicina tradicional en el uso de plantas

medicinales y la separación a *posteriori* de los compuestos biológicamente activos (Hol, 1986; Hol, 1987).

Recientemente se ha comenzado a hacer uso del conocimiento de la estructura tridimensional de las biomacromoléculas y, por su importancia, fundamentalmente de las proteínas "blancos" potenciales de medicamentos en el diseño de los mismos. Para ello se han utilizado ampliamente las coordenadas de los átomos que conforman las proteínas contenidas en los bancos de datos y obtenidas mediante la cristalografía de proteínas (Blundell y Johnson, 1976). En algunos casos se han utilizado las técnicas de modelación por homología o por ensamblaje de pedazos de estructuras conocidas y resueltas mediante la cristalografía de proteínas (Sali *et al.*, 1990; Sutcliffe *et al.*, 1987; Blundell *et al.*, 1987).

La máxima aspiración en el diseño racional de los nuevos medicamentos es la resolución de la estructura tridimensional de la proteína "blanco" formando complejo con el medicamento potencial y utilizando un método experimental de determinación de la estructura tridimensional de

proteínas. Los sistemas gráficos de computación son de la máxima utilidad para estos propósitos.

La figura 1 muestra el ciclo para el diseño racional de nuevas drogas utilizando el conocimiento de la estructura tridimensional de las proteínas "blancos".

La presente revisión no pretende ser exhaustiva. Nuestro objetivo es discutir algunos ejemplos de diseños racionales de medicamentos, conociendo la estructura tridimensional de las proteínas "blancos", para documentar la importancia de la presente aproximación a los investigadores relacionados con la búsqueda de nuevas drogas y a otros lectores menos relacionados con la estructura de proteínas.

Hemos profundizado en el ejemplo del diseño de medicamentos donde la proteína "blanco" es una proteasa aspártica, no solo por la importancia terapéutica del mismo, sino también por el gran número de trabajos realizados en esta dirección, por lo que consideramos que es un buen ejemplo

metodológico de los problemas que se presentan al diseñar un nuevo medicamento siguiendo esta aproximación.

### Presentación de tres casos

En el diseño racional de medicamentos siguiendo esta metodología, pueden presentarse tres casos:

- 1) Una proteína humana no funciona correctamente. En este caso es necesario solamente el conocimiento de la estructura de la proteína "blanco".
- 2) La proteína "blanco" potencial del medicamento es una proteína importante del organismo patógeno que infecta y no tiene contrapartida en el organismo humano. Es necesario solamente el conocimiento de la estructura de la proteína "blanco" del organismo patógeno.
- 3) La proteína "blanco" potencial es una proteína importante del patógeno y existe una (o varias) proteínas humanas

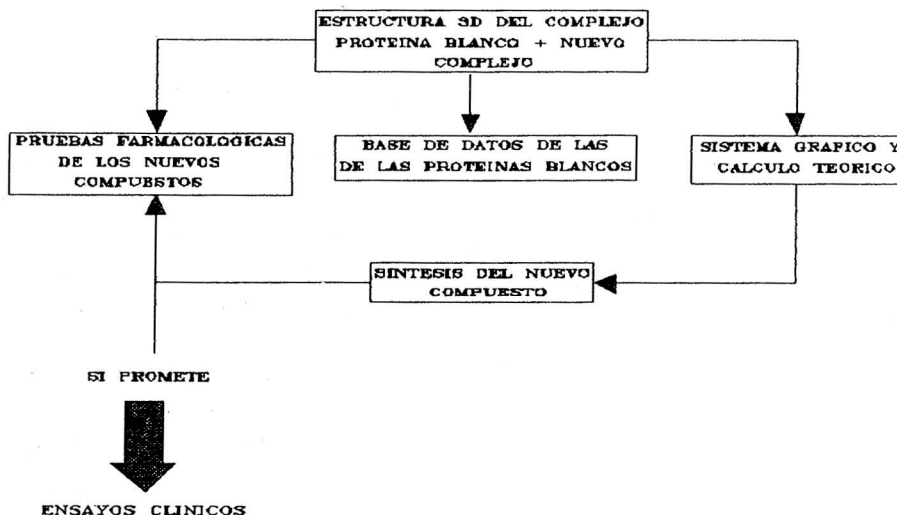


FIG. 1. Ciclo para el diseño de nuevos medicamentos en base al conocimiento de la estructura tridimensional de proteínas.

homólogas. En este caso la proteína "blanco" debe ser inhibida selectivamente. Es necesario el conocimiento de la estructura tridimensional de ambas proteínas a alta resolución. (Ejemplo: para el tratamiento del cáncer, la inhibición de la enzima dehidrofolato reductasa), (Kuyper *et al.*, 1985).

En los casos considerados en 2) y 3), donde las enfermedades son causadas por organismos invasores dañinos (patógenos), los medicamentos que se diseñen tienen que interferir con trayectorias metabólicas cruciales del patógeno sin afectar sustancialmente al organismo humano.

Está claro que la utilización de esta aproximación para el diseño de nuevos medicamentos debe ser completada con la consideración de otros aspectos, como son:

- Modos inesperados de enlace del nuevo compuesto sintetizado.
- El medicamento potencial no llegara a interactuar con la esperada proteína "blanco".
- El proceso metabólico pudiera transformar el medicamento potencial en un compuesto inefectivo.
- El compuesto sintetizado pudiera ser tóxico.

Por tanto este estudio debe llevar a un entendimiento gradual del modo de interacción de un grupo de compuestos con la potencial proteína "blanco".

## Caso 1

Como ejemplo clásico donde el origen de una enfermedad se debe al funcionamiento incorrecto de una proteína humana, se tiene a la anemia siclémica, que

es una enfermedad genética donde un aminoácido de la cadena beta de la hemoglobina es mutado (beta 6 Glu-Val).

La hemoglobina es una de las primeras proteínas globulares cuya estructura tridimensional fue estudiada por cristalografía de proteínas (Dickerson y Geis, 1973). A causa de la mutación experimentada, las moléculas de hemoglobina siclémica forman agregados moleculares en la deoxigenación, lo que conduce a una deformación de los eritrocitos que impide su paso a través de los capilares. Los estudios realizados por cristalografía de proteínas de cadenas lineales de moléculas de hemoglobina siclémica (Padlan y Love, 1985), han permitido el diseño de sustancias químicas como son los derivados del dibenzil dialdehído y otros compuestos (Wireko y Abraham, 1991), que inhiben la proliferación de dichos agregados, por lo que pueden ser utilizados con buenos resultados como agentes antisiclémicos.

## Caso 2

La penicilina es el ejemplo más conocido de un compuesto que inhibe un mecanismo vital metabólico de un patógeno, en este caso las bacterias, y que no tiene contrapartida en el humano. Las penicilinas inhiben la síntesis de la pared bacteriana, ejerciendo una acción bactericida sobre los organismos en crecimiento y división. La pared de las bacterias gram positivo y gram negativo poseen como elemento común el péptido-glicano que es un heteropolímero con dos cadenas de polisacáridos de unas 50 unidades, unidas a su vez por pequeños péptidos (Freidfelder, 1983). Las penicilinas interfieren uno de los últimos pasos de la formación de dichos péptidos, inhibiendo la

formación de enlaces cruzados entre las cadenas de polisacáridos por enzimas transpeptidasas o carboxipeptidasas, inactivando la acción de estas enzimas mediante la formación de complejos con las mismas.

Como resultado de la transferencia y recombinación genética, un número creciente de especies bacterianas producen beta-lactamasas, enzimas que transforman rápidamente los anillos beta-lactámicos de las penicilinas en metabolitos inactivos, mediante la hidrólisis del enlace beta-lactama. La figura 2 muestra la acción de las beta-lactamasas sobre el anillo beta-lactama de las penicilinas.

Toda bacteria contiene un tipo (o varios tipos) de proteínas enlazadas a las membranas con las que la penicilina puede interactuar (Penicillin-Binding-Proteins, PBPs), que están relacionadas con funciones celulares como la elongación y la separación (Ferreira *et al.*, 1988). Estas proteínas muestran diferentes sensibilidades a los antibióticos beta-lactámicos (penicilinas y cefalosporinas). A pesar de su diversidad, las PBPs a las que pueden asignárseles una actividad catalítica poseen una serina en el sitio activo y funcionan como D-D peptidasas.

Se ha observado cierta semejanza entre las estructuras secundarias de las

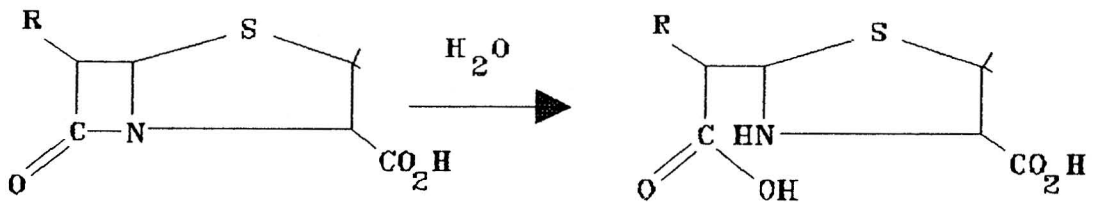


FIG. 2. Hidrólisis del enlace beta-lactámico por las beta-lactamasas.

Más de 80 beta-lactamasas diferentes han sido identificadas. Muchas de las estructuras tridimensionales de estas enzimas han sido determinadas a alta resolución, así como formando complejos con diferentes inhibidores. Estos estudios van encaminados al diseño de modificaciones de la molécula de la penicilina que permitan evadir la acción de las beta-lactamasas y que además se fijen fuertemente en el sitio activo de las peptidasas que catalizan la síntesis del péptido-glicano.

carboxipeptidasas de bacterias (D Ala-D Ala carboxipeptidasas), que cortan el péptido de las paredes bacterianas y de algunas beta-lactamasas. Esto indica cierta relación en la evolución entre los dos grupos de enzimas mencionados y podrían constituir otro ejemplo de evolución divergente, ya que además comparten el mismo mecanismo catalítico básico, reconocen el compuesto beta-lactámico y conservan ciertos aminoácidos comunes en el sitio activo (Kelly *et al.*, 1986).

**Tabla 1**  
**CLASIFICACION DE LAS PROTEASAS SEGUN EL GRUPO FUNCIONAL PRESENTE EN EL SITIO ACTIVO. LAS NUMERACIONES CORRESPONDEN A LA QUIMOTRIPSINA PARA LAS SERINICAS, PEPSINA PARA LAS ASPARTICAS Y PAPAINA PARA LAS CISTEINICAS**

PROTEASAS	Serínicas	Ser 195 Asp 102 His 57	pH neutro
	Aspárticas	Asp 32 Asp 215 Cys 25	pH ácido fund.
	Cisteínicas	His 159	pH neutro
	Metaloproteasas	Zn	pH neutro

La denominación de las p.a. proviene de la existencia en el sitio activo de dos ácidos aspárticos, esenciales para el funcionamiento de estas enzimas.

Las p.a. pueden encontrarse en:

- estómago de los mamíferos (pepsina, gastricsina y quimosina)
- lisosomas (catepsina D)
- riñones (renina)
- levaduras y hongos (rizopuspepsina, penicilopepsina y endotiapepsina)
- retrovirus.

Mediante el conocimiento de un número elevado de secuencias de aminoácidos de p.a. (24 hasta 1990), provenientes de

diferentes organismos, se ha observado una elevada homología entre ellas. Este aspecto, sumado a la similitud en la estructura tridimensional de un grupo de estas enzimas cuyas estructuras son conocidas a alta resolución (8 hasta 1990), sustentan el criterio de que las p.a. forman una familia de proteínas que poseen un origen común en la evolución (Davies, 1990; Tang y Wong, 1987). Otro aspecto que sustenta esta hipótesis es el hecho de que las p.a. son universalmente inhibidas por la pepstatina que es un inhibidor de origen natural que contiene al aminoácido inusual estatina (James *et al.*, 1982; Cooper, Foundling y Blundell, 1989).

**Tabla 2**  
**ESTRUCTURAS CRISTALINAS DE PROTEASAS ASPARTICAS**

Pepsina porcina	2.	Abad-Zapatero <i>et al.</i> , 1990. Andreeva <i>et al.</i> , 1984.
Endothiapepsina	2.1	Sali <i>et al.</i> , 1989.
Quimosina Rec.	2.3	Gilliland <i>et al.</i> , 1990.
Pepsinógeno Porcino	1.7	James y Sielecki, 1986.
Penicilopepsina	1.8	James y Sielecki, 1983.
Renina Rec. Hum.	2.5	Sielecki <i>et al.</i> , 1989.
Rizhopuspepsina	1.8	Suguna <i>et al.</i> , 1987. Navia <i>et al.</i> 1989.
Mucorpepsina	2.6	*
HIV-1 Protease	2.1	Jakolski <i>et al.</i> , 1991.
Rous Sarcoma Virus proteasa	3.	Miller <i>et al.</i> , 1989.

\* Anuncio preliminar. Foltmann, B. (1988), en *Abstr. Lindertren-Lang Conference.*

La tabla 2 muestra las p.a. estudiadas por cristalografía de proteínas (Davies, 1990).

La posibilidad de contar con un número de estructuras tridimensionales de p.a. a alta resolución, ha permitido realizar estudios a nivel molecular de estas enzimas en el diseño de nuevos medicamentos.

### **Características generales de las proteasas aspárticas**

La mayoría de las p.a. de mamíferos, plantas, y hongos están constituidas por una cadena simple de peso molecular aproximado de 35 kDa. La longitud promedio de esta cadena es de 327 residuos de aminoácidos, con 5% de identidad en secuencia entre todos los miembros de la familia (Davies, 1990).

Todas las p.a. de vertebrados y probablemente la mayoría de las provenientes de hongos son sintetizadas como zimógenos inactivos y contienen un segmento adicional en el extremo NH<sub>2</sub> terminal de una longitud aproximada de 45 residuos de aminoácidos, que es cortado y separado en el proceso de activación de la enzima (James y Sielecki, 1986; Andreeva *et al.*, 1984; Abad-Zapatero, Rydel y Erickson, 1990; Pearl y Blundell, 1984). Las p.a. de los retrovirus son considerablemente menores. Tienen una longitud promedio de 130 residuos de aminoácidos y están conformadas por dos cadenas polipeptídicas de igual longitud.

En la búsqueda de nuevas drogas utilizando el conocimiento de la estructura tridimensional de proteínas, el diseño de inhibidores y de compuestos que impidan la formación de oligómeros, son las aproximaciones que más se han utilizado.

El diseño de inhibidores es la problemática que mayores esfuerzos le han sido dedicados.

Se ha establecido que la inhibición de proteasas es una estrategia válida en farmacología. Los efectos farmacológicos más significativos obtenidos con la inhibición de proteasas son: la inhibición de la trombina (anticoagulante); inhibición de la kaliceína (en *shock* y en coagulación intravascular diseminada); inhibición de la elastasa (en *shock* y enfisema); (todas estas son proteasas serínicas), y la inhibición de la renina (en el tratamiento de la hipertensión) que es una proteasa aspártica.

Los estudios de los complejos de las enzimas con sus inhibidores o análogos del sustrato mediante la cristalografía de proteínas, han sido utilizados no sólo en el diseño de nuevos medicamentos, sino en la explicación de los mecanismos de acción de las enzimas, por la imposibilidad práctica de estudiar los complejos enzima-sustrato, en virtud de la rapidez de estos procesos en relación con los tiempos que se necesitan para su estudio mediante la difracción de rayos X (Hajdu *et al.*, 1988).

Pasaremos a analizar las estrategias seguidas en el diseño de medicamentos donde la proteína "blanco" es una proteasa aspártica. Primeramente analizaremos los estudios realizados en la inhibición de la renina y posteriormente los estudios contra el VIH.

Como las proteasas aspárticas se encuentran en diversos organismos, incluyendo el humano, debemos considerarlas incluidas en el tercer caso de la metodología explicada.

## Las proteasas aspárticas y la hipertensión

El primer estudio realizado sobre el diseño de un medicamento utilizando el conocimiento de la estructura tridimensional donde la proteína "blanco" es una proteasa aspártica, es el caso de la renina en el tratamiento de la hipertensión (Sibanda *et al.*, 1984; Plattner *et al.*, 1986; Blundell *et al.*, 1987). La hipertensión es un problema importante de salud, contribuyendo a las enfermedades cardiovasculares, *shocks* y problemas renales. En el humano, la hormona angiotensina II, un octapéptido, actúa como potente vasoconstrictor en la regulación de la presión sanguínea y en el balance de los fluidos. Altas concentraciones de esta hormona conllevan mayores presiones sanguíneas pues el enlace de ella a su receptor, inicia un proceso vasoconstrictor

y de retención del sodio y del agua en los riñones. Esto incrementa el volumen de la sangre y, por tanto, la presión arterial.

La hormona es producida en dos pasos. Primeramente la enzima renina cataliza la ruptura de la prohormona inactiva, el angiotensinógeno, produciendo la angiotensina I, que es un decapeptido. Como segundo paso, la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), cataliza la eliminación del dipéptido C-terminal de la angiotensina I, dando como resultado la angiotensina II, que es la hormona activa. La figura 3 muestra la secuencia seguida en la liberación de la angiotensina II.

La inhibición de la renina o de la ACE o ambas, conduce a la disminución de la angiotensina II y, por tanto, a la disminución de la presión sanguínea.

La renina es una enzima altamente específica, siendo el angiotensinógeno su único sustrato conocido. Su alta

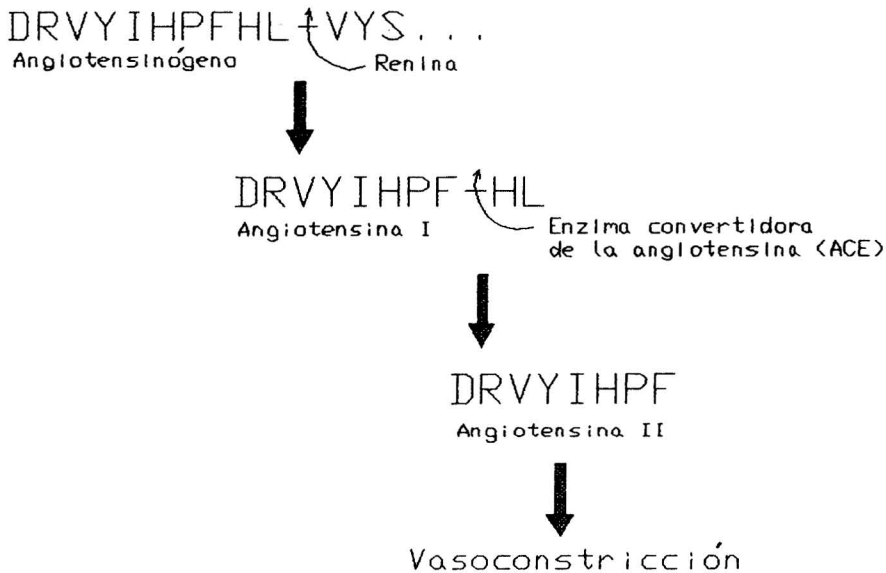


FIG. 3. Formación de la angiotensina II, catalizada por las enzimas proteolíticas renina y la enzima convertidora del angiotensinógeno (ACE).

especificidad es ventajosa en el diseño de inhibidores, pues otras proteasas aspárticas presentes en el humano no son inhibidas, pero el conocimiento de su estructura tridimensional debe realizarse, por tanto, a una alta resolución.

La búsqueda de los inhibidores de la renina que sean adecuados para su uso en humanos, ha sido un largo trabajo de más de 10 años (Morris *et al.*, 1985; Foundling *et al.*, 1987; Veerapandian *et al.*, 1990; Sali *et al.*, 1989) y donde aún quedan problemas por resolver.

El diseño de los inhibidores de la renina ha sido realizado a través de la modificación sistemática de la secuencia del angiotensinógeno (su sustrato), introduciendo modificaciones en el sitio de corte, como son isoésteres que simulen el estado transicional tetrahédrico o aminoácidos con cadenas laterales inusuales como la estatina.

Los estudios de la inhibición de las p.a. condujeron a la identificación de la pepstatina como inhibidor universal de estas proteasas con una  $k_i = 5 \times 10^{-11}$  M para la pepsina (James *et al.*, 1982). En la figura 4 se muestra la fórmula química de este inhibidor.

De esta manera, la búsqueda de inhibidores de la renina se ha centrado en el diseño y el análisis de análogos de la secuencia mínima del sustrato requerida para lograr la inhibición (residuos del 6 al 13 del angiotensinógeno). Los inhibidores que poseen el enlace de corte Leu110-Val11 del sustrato reemplazados por análogos no hidrolizables del tipo  $-\text{CH}_2\text{-NH}-$  o que simulen la estatina ( $\text{CH-CH}_2\text{CO-NH}$ ), han sido probados como buenos inhibidores de la renina.

La sustitución del sitio de corte Leu-Val por un isoéster de hidroxietileno más corto ( $-\text{CH}_2\text{-OH-CH}_2-$ , enantiómero S), ha resultado también un potente inhibidor de la renina humana.

Un aspecto común de los inhibidores estudiados para estas enzimas, tanto en contenido a base de estatina, como contenido a base de hidroxietileno, es que se enlazan a la enzima en una conformación extendida.

La estructura tridimensional de la renina nativa por cristalografía de proteínas fue determinada sólo recientemente a resolución media (Sielecki *et al.*, 1989), por lo que los estudios de inhibidores realizados hasta la fecha se han hecho utilizando las

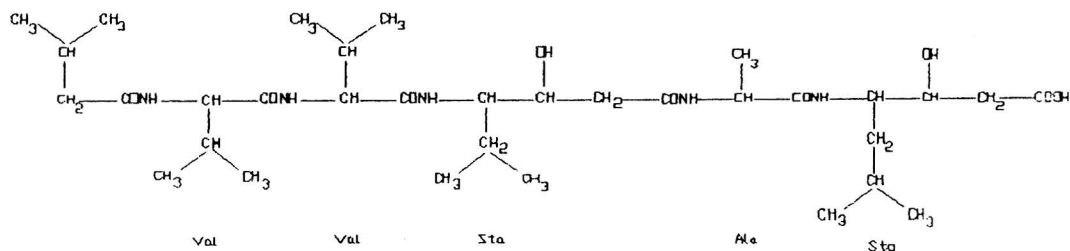


FIG. 4. Fórmula química de la pepstatina, inhibidor natural universal de las p.a. que contiene al aminoácido inusual estatina, que simula el estado transicional tetrahédrico o intermediario de la hidrólisis del enlace peptídico[-C(OH)2NH-].



estructuras de las p.a. de hongos conocidas a alta resolución, seguidos de análisis utilizando las técnicas de modelación por homología, de reemplazamiento molecular y métodos de refinamiento por dinámica molecular. A pesar de ello, potentes inhibidores de la renina humana han sido diseñados con  $ki = 10(-9)$ . Sin embargo, la mayoría de ellos no son adecuados para su administración oral y poseen un tiempo de vida corto en la circulación.

La dificultad que ha existido en diseñar un inhibidor de la renina útil en la terapéutica, se debe en parte al carácter peptídico de estos tipos de compuestos, por presentar varios problemas como son:

- Pobre absorción y transporte gastrointestinal.
- Inestabilidad proteolítica.
- Excreción biliar rápida.

Un análisis de esta problemática ha llevado a la conclusión de que el tamaño de estas sustancias peptídicas representa una propiedad que afecta los tres fenómenos señalados. La relación existente entre el peso molecular del inhibidor y su transporte, su inestabilidad proteolítica y su razón de excreción indica que la reducción del tamaño del inhibidor representa una estrategia importante en el diseño de estos.

La búsqueda de moléculas más pequeñas y estables para la inhibición de la renina con fines terapéuticos se hará con el conocimiento de la estructura del complejo renina-inhibidor, que ya está en estudio por cristalografía de proteínas (Blundell, 1990).

Otros estudios de inhibidores no peptídicos de estas proteasas también están siendo realizados aunque todavía sin utilizar el conocimiento de la estructura

tridimensional de las p.a. formando complejos con dichos inhibidores (Jaskólski *et al.*, 1991; Moelling *et al.*, 1989; Blumenstern *et al.*, 1989).

## Las proteasas aspárticas en el VIH

La transcriptasa inversa, la integrasa y una proteasa son las tres enzimas virales que intervienen en la replicación de los retrovirus y de manera particular para el VIH-1, por lo que cada una de ellas representan un posible "blanco" en el diseño de nuevos medicamentos contra la acción de este virus. La proteasa es la única de las tres enzimas cuya estructura nativa y con la presencia de inhibidores es ya conocida (Weber *et al.*, 1989; Blundell *et al.*, 1990). Este trabajo ha sido prácticamente realizado en pocos años, puesto que en 1985 solamente se tenía el gen que codifica para dicha enzima.

De los estudios realizados se ha concluido que esta proteasa viral es un miembro de la bien caracterizada familia de las p.a., pues posee la secuencia Asp-Thr-Ser-Gly, es inhibida por la pepstatina y su estructura tridimensional es muy parecida al resto de las estructuras de las p.a. conocidas. A diferencia del resto de las p.a. de mamíferos y de hongos, la proteasa viral está formada por dímeros de subunidades idénticas de 99 residuos de aminoácidos. La función de esta proteasa es cortar la poliproteína viral gag-pol en componentes discretos funcionales. Sin actividad de tipo proteasa la partícula viral no es infectiva, según estudios realizados *in vitro*. Esta propiedad permite tomar a esta proteasa como proteína "blanco" potencial para el diseño de nuevos medicamentos con vistas a su utilización terapéutica contra la acción del VIH.

El conocimiento de la estructura tridimensional de la p.a. del VIH (Wlodawer *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1989; Navia *et al.*, 1989; Swain *et al.*, 1990), está permitiendo el diseño de nuevos medicamentos encaminados tanto a la inhibición de la enzima por enlace de los compuestos sintetizados ubicados en el sitio activo, como en la interferencia en la formación de los dímeros funcionales. En este último aspecto se ha observado que una de las estructuras beta terminales contiene una Cys libre, sugiriendo un sitio de enlace covalente para un compuesto diseñado según ese esquema.

Los trabajos realizados con los inhibidores de la renina han permitido contar con una experiencia previa muy valiosa para el diseño de los inhibidores de la proteasa del VIH. En este caso es necesario también tener en cuenta la especificidad de esta enzima para no inhibir otras p.a. presentes en el organismo humano. Para realizar una catálisis efectiva, la p.a. del VIH parece necesitar un péptido de al menos siete residuos de aminoácidos. Además esta enzima muestra una especificidad inusual en su habilidad de corte de la poliproteína en fragmentos que contengan Pro en el sitio P' (Tyr-Pro), y también muestra cierta especificidad en la secuencia Met-Met.

Los isoésteres dipeptídicos que son inhibidores competentes reversibles de la p.a. del VIH deben situarse en el sitio de corte del sustrato mimificado por el inhibidor. Algunos péptidos (hexa o hepta) derivados de sitios conocidos de corte de la proteína viral gag-pol han sido sintetizados para su uso como posibles inhibidores de la p.a. del VIH.

## CONCLUSIONES

Los estudios de diseño de nuevos medicamentos basados en el conocimiento de la estructura tridimensional de proteínas "blancos" potenciales, han mostrado ser de gran utilidad. La cristalografía de proteínas es la metodología que más se ha utilizado en la solución de esta problemática.

La búsqueda de inhibidores de la renina para el tratamiento de la hipertensión es un ejemplo típico de la aplicación de esta aproximación y donde otras consideraciones, a causa del carácter peptídico de los compuestos diseñados como inhibidores, deben ser tenidas en cuenta.

Los esfuerzos realizados para diseñar inhibidores de la renina adecuados en la terapéutica de la hipertensión, han servido de base en los estudios de la inhibición de la proteasa del VIH, que es vital en el proceso infectivo de este retrovirus.

## REFERENCIAS

- ABAD-ZAPATERO, C.; T.J. RYDEL y J. ERICKSON (1990). Revised 2.3 Å structure of porcine pepsin: evidence for a flexible subdomain. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 8: 62-81.
- ANDREEVA, N.S.; A.S. ZDANOV; A.E. GUTCHINA y A.F. FEDOROV (1984). Structure of ethanol-inhibited Porcine Pepsin at 2Å resolution and binding of the methyl ester of phenylalanyl-diiodotyrosine to the enzyme. *J. Mol. Biol.* 259: 11353-11365.
- BARRET, A.J. (1986). "An introduction to the proteinases". En: *Proteinase Inhibitors*:3-22. Barret and Sulvesen Editors, Elsevier Science Publishers, BV.
- BLUNDELL, T. (1990). X-ray analysis of eukaryotic and retroviral proteinases and the design of the antihypertensive agents and AIDS antivirals. *Abstracts of the Symposium on Crystallography and Molecular Biology*, Guarujá, Brasil.
- BLUNDELL, T.L. y L.N. JOHNSON (1976). *Protein Crystallography*. Academic Press, N.Y..

- BLUNDELL, T.L.; A.F. LAPATTO; A.F. WILDERSPIN; A.M. HEMMINGS; P.M. HOBART; D.E. DANLEY y P.J. WHITTLE (1990). The 3-D structure of HIV-1 proteinase and the design of the antiviral agents for the treatment of AIDS. *TIBS* 15: 425-430.
- BLUNDELL, T.L.; B.L. SIBANDA; M.J.E. STERNBERG y J.M. THORTON (1987). Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature* 326: 347-352.
- BLUNDELL T.L.; J. COOPER; S.I. FOUNDLING; D.M. JONES; B. ATRASH y M. SZILKE (1987). On the rational design of renin inhibitors: X-ray studies of aspartic proteinases complexed with transition states analogues. *Biochemistry* 26: 5585-5590.
- BLUMENSTEIN J.J.; T.D. COPELAND; S. ZOROSZLAN y C.J. MICHEJDA (1989). Synthetic non peptide inhibitors of HIV protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 980-987.
- COOPER J.B.; S.I. FOUNDLING y T.L. BLUNDELL (1989). X-ray studies of aspartic proteinase-statine inhibitor complexes. *Biochemistry* 28: 8596-8603.
- DAVIES, D.R. (1990). The structure and function of the aspartic proteinases. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 19: 189-215.
- DICKERSON R.E. y I. GEIS (1973). *The Structure and Action of Proteins*, pp. 44-59.
- FERREIRA L.C.S.; U. SCHWARZ; W. KECK; P. CHARLIER; O. DIDEBERG y J.M. GHUYSEN (1988). Properties and crystallization of a genetically engineered, water-soluble derivative of penicillin-binding protein 5 of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* 171: 11-16.
- FOUNDLING S.I.; J. COOPER; F.E. WATSON; A. CLEASBY; L.H. PEARL; B.L. SIBANDA; A. HEMMINS; S.P. WOOD y T.L. BLUNDELL (1987). High resolution X-ray analyses of renin inhibitor-aspartic proteinase complexes. *Nature* 327: 349-352.
- FREIFELDER, D. (1983). *Molecular Biology. A Comprehensive Introduction to Prokaryotes and Eukaryotes*. E.R. Ed. pp. 220-223.
- GILLILAND G.L.; E.L. WINBORNE; J. NACHMAN y A. WLODAWER (1990). The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution. *Protein: Structure, Function and Genetics*. 8: 82-101.
- HAJDU J.; K.R. ACHARYA; D.J. STUART; D. BARFORD y L.N. JOHNSON (1988). Catalysis in enzyme crystals. *TIBS*. 13: 104-109.
- HOL, W.G.J. (1986). Protein crystallography and computer graphics toward rational drug design. *Angewandte Chemie* 25: 767-778.
- HOL, W.G.J. (1987). Applying knowledge of protein structure and function. *TIBTECH*. 5: 137-143.
- HOL, W.G.J. y R.K. WIERENGA (1990). *Protein Crystallography, Glycosomes and the design of drugs to Macromolecular Targets*. Bedell C.R. Ed. Wiley and Sons, N.Y..
- JAMES, M.N.G. y A.R. SIELECKI (1987). *Aspartic Proteinases and their Catalytic Pathways*. Jurnick A. y A. Mc.Pheron Ed. John Wiley and Sons, Inc.
- JAMES, M.N.G. y A.R. SIELECKI (1986). Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution. *Nature* 319: 299-361.
- JAMES M.N.G. y A.R. SIELECKI (1983). Structure and Refinement of penicillopepsin at 1.8 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 163: 299-361.
- JAMES, M.N.G.; A.R. SIELECKI; F. SALITURE; D.H. RICH y T. HOFFMANN (1982). Conformational flexibility in the active sites of aspartyl proteinases revealed by a pepstatine fragment binding to penicillopepsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 6137-6141.
- JASKOLSKI, M.; A.G. TOMASSELLI; T.K. SAWYER; D.G. STAPLES; R.L. HEENRIKSON; J. SCHNEIDER; S.B.H. KENT y A. WLODAWER (1991). Structure at 2.5 Å resolution of chemically synthesized human immunodeficiency virus type 1 protease, complexed with a hydroxyethylene-based inhibitors. *Biochemistry* 30: 1600-1609.
- KELLY, J.A.; O. DIDEBERG; P. CHARLIER; J.P. WERY; M. LIBERT; P.M. MOEUS; J.R. KNOX; C. DUEZ; C.L. GRAIPONT; B. JORIS; J. DUSART; J.M. FRERE y J.M. GHUYSEN (1986). On the origin of bacterial resistance to penicillin: comparison of a beta-lactamase and a Penicillin target. *Science* 231: 1429-1431.
- KUYPER, L.F.; B. ROTH; D.P. BACCANARI; R. FERONE; C.R. BEDDEL; J.N. CHAMPNESS; D.K. STAMMERS; J.G. DANN; F.E. NORRINGTON; D.H. BAKER y P.T. GOODFORD (1985). Receptor-based design of dehydrofolate reductase inhibitors: comparison of crystallographically determined enzyme binding with enzyme affinity in a series of carboxy-substituted trimethoprim analogues. *J. Med. Chem.* 28: 303-311.

- MATHEUS, D.A.; J.T. BOLI; J.M. BURRIDGE; D.J. FILMAN; K.W. VOLZ y J. KRAUT (1985). Dehydrofolate-reductase. The stereochemistry of inhibitor selectivity. *J. Biol. Chem.* **260**: 392-399.
- MILLER, M.; B.K. SCHNEIDER; B.K. SATHYANARAYANA; M.V. TOTH; G.R. MARSHALL; L. CLAWSON; L. SELK; S.B.H. KENT y A. WLODAWER (1989). Structure of complex synthetic HIV-1 protease with a substrate-based inhibitor at 2.3 Å resolution. *Science* **246**: 1149-1151.
- MILLER, M.; M. JASKOLSKI; J.K. MOHANA RAO; J. LEIS y A. WLODAWER (1989). Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. *Nature* **337**: 576-579.
- MOELLING, K.; T. SCHULZE; M.T. KNOOP; J. KAY; R. JUPP; G. NICOLAU y L.H. PEARL (1990). *In vitro* inhibition of HIV-1 proteinase by cerulenin inhibitor. *FEBS Lett.* **261**: 373-377.
- MORRIS B.J.; J.M. GUSS y D.F. CATANZARO (1985). A structural analysis of human renin. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **12**: 299-304.
- NAVIA, M.A.; P.M.D. FITZGERALD; B.M. MC KEEVER; C.T. LEU; J.C. HEIMBACH; W.K. HERBER; I.S. SIGAL; P.L. DARKE y J.P. SPRINGER (1989). Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* **337**: 615-620.
- NAYLER, J.H.C. (1991). Early discoveries in the penicillin series. *TIBS* **185**: 195-197.
- PADLAN, E.A. y W.E. LOVE (1985). Refined crystal structure of deoxyhemoglobin S. *J. Biol. Chem.* **260**: 8272-8291.
- PEARL, L. y T. BLUNDELL (1984). The active site of aspartic proteinases. *FEBS. Lett.* **174**: 96-101.
- PLATTNER, J.J.; J. GREER; A.K.L. FUNG; H. STEIN; H.D. KLINERT; H.L. SHARM; J.R. SMITAL y T.J. PERUN (1986). Peptide analogues of angiotensinogen. Effect of peptide chain length on renin inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **139**: 982-990.
- READ, R.J.; R.K. WIERENGA; H. GROENDIJK; W.G.J. HOL; A. LOMBEIR y F.R. OPPERDOES (1987). Preliminary crystallographic studies of glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei brucei*. *J.Mol.Biol.* **194**: 573-575.
- SALI, A.; J.P. OVERINGTON; M.S. JOHNSON y T.L. BLUNDELL (1990). From comparisons of protein sequences and structures to protein modelling and design. *TIBS* **15**: 235-240.
- SALI, A.; B. VEERAPANDIAN; J.B. COOPER; S.I. FOUNDLING; D.J. HOOVER y T.L. BLUNDELL (1989). High Resolution X-ray diffraction study of the complex between endothiapepsin and an oligopeptide inhibitor: the analysis of the inhibitor binding and description of the rigid body shift in the enzyme. *EMBO J.* **8**: 2179-2188.
- SCHNEBLI, H.P. y N.J. BRAUN (1986). "Proteinase inhibitors as drugs". En: *Proteinase Inhibitors*: 613-623. Barret and Salvesen Editors. Elsevier Science Publishers BV.
- SIBANDA, B.L.; T. BLUNDELL; P.M. HOBART; M. FOGLIANO; J.S. BINDRA; B.W. DOMANY y J.M. CHIRGWIN (1984). Computer graphic modelling of human renin. *FEBS Lett.* **174**: 102-111.
- SIELECKI A.R.; K. HAYAKAWA; M. FUJINAYA; M.P.E. MURPHY; M. FRASER; A.K. MUIR; C.T. CARILI; J.A. LEWICKI; J.D. BAXTER y M.N.G. JAMES (1989). Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular-active drugs, at 2.5 Å resolution. *Science* **243**: 1346-1351.
- SUTCLIFFE, M.J.; I. HANEEF; D. CARNEY y T.L. BLUNDELL (1987). Knowledge based modelling of homologous proteins. *Protein Engineering* **1**: 377-384.
- SUGUNA, K.; R.R. BOTT; E.A. PADLAN; E. SUBRAMANIAN; S. SHERIF; G.H. COHEN y D.R. DAVIES (1987). Structure and refinement at 1.8 Å resolution of the aspartic proteinase from *Rhizopus Chinensis*. *J. Mol. Biol.* **196**: 877-900.
- SWAIN, A.L.; M.M. MILLER; J. GREEN; D.H. RICH; J. SCHEIDER; S.B.H. KENT y A. WLODAWER (1990). X-ray crystallographic structure of a complex between synthetic protease of human immunodeficiency virus-1 and a substrate-based hydroxyethylamine inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8805-8809.
- TANSIK, R.L.; D.R. AVERET; B. ROTH; S.J. PATERSON; D. STONE y D.P. BACCARANI (1985). Species specific irreversible inhibition of *N* gonorrhoeae dehydrofolate reductase by a substituted 2,4-diamino-5-benzyl pyrimidine. *J. Biol. Chem* **259**: 12299-12303.
- TANG, J. y R.N.S. WONG (1987). Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J. Cellular Biochem.* **33**: 53-63.
- VALLE, F.; P. BALBAS; E. MERINO y F. BOLIVAR (1991). The role of penicillin amidases in nature and industry. *TIBS* **181**: 36-40.

- VEERAPADIAN, B.; J.B. COOPER; A. SALI y T.L. BLUNDELL (1990). X-ray analyses of aspartic proteinases. *J. Mol. Biol.* **216**: 1017-1029.
- WEBER, I.T.; M. MILLER; M. JASKOLSKI; J. LEIS; A.M. SKALKA y A. WLODAWER (1989). Molecular modelling of the HIV-1 protease and its substrate binding site. *Science* **243**: 928-931.
- WIERENGA, R.K., K.H. KALK y W.G.J. HOL (1987). Structure determination of glycosome triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **198**: 109-121.
- WIREKO, F.C. y D.J. ABRAHAM (1991). X-ray diffraction study of the binding of the antisickling agent 12C79 to human hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2209-2211.
- WLODAWER, A.; M. MILLER; M. JASKOLSKI; B.K. SATHYANARAYANA; E. BALDWIN; I.T. WEBER; L.M. SELT; L. CLAWSON; J. SCHNEIDER y S.B.H. KENT (1989). Conserved folding in retroviral proteases. Crystal Structure of a Synthetic HIV Protease. *Science* **245**: 616-621.