



PROTEASES COMO ALVOS DE QUIMIOTERAPIA

Desenho de inibidores baseado na estrutura

A clivagem proteolítica de ligações peptídicas é uma das mais frequentes e importantes modificações pós-traducionais de proteínas. As

peptidases (proteases) recebem o prefixo endo- quando clivam ligações no meio de cadeias polipeptídicas, podendo, neste caso, ser chamadas também de proteinases, e o prefixo exo- quando clivam ligações em uma das extremidades da cadeia polipeptídica, compreendendo as chamadas amino- e carboxipeptidases. Historicamente, o estudo das proteases iniciou-se com o interesse de fisiologistas e bioquímicos na digestão proteica em seres humanos. Por este motivo, as proteases digestivas contidas nas secreções do pâncreas e estômago estão entre as enzimas melhor caracterizadas, e muito do conhecimento atual sobre estrutura e função de enzimas se deve ao estudo destas proteases.

Talvez, o maior progresso no estudo de proteases tenha sido o estabelecimento de uma classificação racional baseada na comparação dos sítios ativos, no mecanismo de ação e na estrutura tridimensional. As quatro classes reconhecidas pela IUBMB (*International Union of Biochemistry*

and Molecular Biology) são: serina, cisteína, aspártico e metalo protease. Posteriormente, foram definidas famílias para agrupar proteases que teriam descendido de um ancestral comum

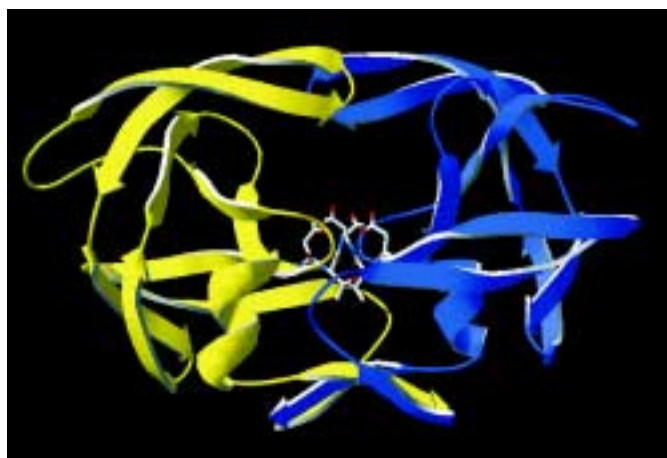


Figura 1: Aspártico protease do HIV. Os monômeros estão coloridos em azul e amarelo. Os resíduos Asp-Thr-Gly do sítio ativo estão representados em “sticks” coloridos em CPK. Notar estrutura simétrica do homodímero, com o eixo de pseudo-simetria diadal, vertical e no plano da página. O assoalho do sítio ativo, ao centro, está em baixo e os *flaps* acima. Esta figura, assim como as demais utilizadas neste trabalho foi gerada no programa Swiss PDB Viewer v. 3.51, a partir da estrutura da HIV-1 protease complexada com o inibidor AG-1343, armazenada no Brookhaven Protein Data Bank (PDB) sob o código 1ohr (Kaldor *et al.*, 1997)

por evolução divergente.

A maior família de peptidases corresponde à família da quimiotripsina (S1). O marco central do sítio ativo destas enzimas é a tríade catalítica Asp¹⁰²,

Floriano Paes Silva Junior

Acadêmico do curso de Farmácia Industrial, UFF. Aluno de IC/PIBIC-CNPq, do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, DBBM, IOC-FIOCRUZ
floriano@gene.dbbm.fiocruz.br

Salvatore Giovanni De Simone

Professor Adjunto, UFF. Chefe do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, DBBM, IOC-FIOCRUZ
dsimone@ioc.fiocruz.br

Ilustrações cedidas pelos autores

His⁵⁷ e Ser¹⁹⁵ (baseado na numeração da quimi tripsina). A catálise procede por meio de um intermediário de estado de transição tetraédrico durante os estágios de acilação e deacilação. O mesmo tipo de mecanismo está envolvido em todas as reações de serina proteases. Nosso entendimento atual do mecanismo de ação destas enzimas é ilustrativo de todo o grupo de enzimas envolvidas na transferência de fragmentos, apesar de que, neste caso, a transferência é para a água. A transferência intermediária da porção acila de um substrato para formar uma ligação covalente com um grupo funcional da enzima é um aspecto comum entre as serina proteases e outras transferases, na biologia. Já as cisteína proteases são caracterizadas por um resíduo de Cys²⁵ catalítico, atuando como a Ser¹⁹⁵ na quimi tripsina. A catálise ocorre por via de um intermediário tiol-éster e é facilitada por cadeias laterais de His¹⁵⁹ e Asp¹⁵⁸. A característica principal das aspártico proteases é um sítio catalítico constituído de dois resíduos de ácido aspártico (32 e 215; numeração da pepsina suína). Metaloproteases possuem como componente ativo um átomo de metal de transição, principalmente zinco.

Diversidade e Importância Biológica das Proteases

O número de proteases investigadas é minúsculo frente ao atual repertório de milhares de enzimas proteolíticas que são codificadas por cerca de 2% dos genes estruturais (Rawlings & Barret, 2000). O interesse em proteases evoluiu a partir do conhecimento de que, além das ações digestivas, estas enzimas estão envolvidas na regulação de muitos processos fisiológicos. Recentemente, um banco de dados online denominado MEROPS (Rawlings & Barret, 2000) tornou-se disponível para usuários de instituições acadêmicas de todo o mundo. Este banco contém um catálogo com uma classificação estrutural de peptidases, baseada na similaridade (estatisticamente significativa) entre segmentos responsáveis pela atividade enzimática.

Em muitos casos, a regulação de processos fisiológicos por proteases é mediada pela associação de domínios não-proteolíticos na estrutura destas

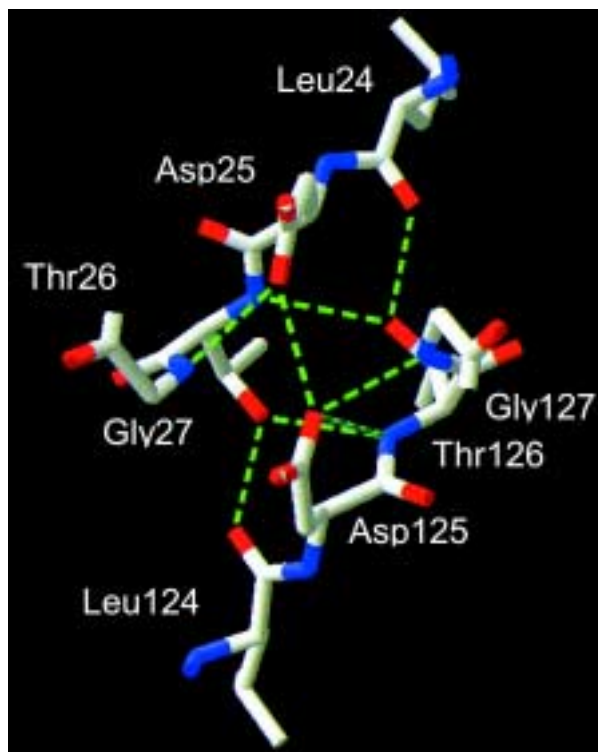


Figura 2: Rede de pontes de hidrogênio (pontilhado verde) formadas por átomos da cadeia principal e das cadeias laterais dos resíduos do sítio catalítico da aspártico-proteinase. Resíduos em palito, coloridos conforme CPK (vermelho – oxigênio, azul – nitrogênio e branco – carbono)

enzimas, que conferem especificidade na interação destas com seus alvos biológicos. Entre as mais estudadas das proteases estão as enzimas envolvidas nas cascatas da coagulação, fibrinólise, sistema complemento e no processamento de precursores hormonais por convertases específicas. O ponto chave aqui, é que um sinal pode ser específica e irreversivelmente amplificado cada vez que um precursor enzimático inativo em uma posição abaixo, na cascata, é ativado. Estes tipos de reações envolvendo a ativação proteolítica de zimogênios, apesar de muito estudadas, vêm sendo rediscutidas em termos da função da chamada região pré-pró destes precursores inativos. Recentemente, foi demonstrado que esta região possui um papel específico, podendo atuar como inibidor ou como chaperonina intramolecular, assegurando o enovelamento apropriado da protease (Khan et al., 1999). Outras áreas de

interesse relacionadas com as proteases incluem a apoptose, a mediação da sinalização da trombina por receptores ativados por proteases, o envolvimento no mecanismo de resistência de patógenos e na doença de Alzheimer. No entanto, a importância das enzimas proteolíticas para o entendimento de tarefas biológicas vitais é talvez melhor ilustrado pelas proteases virais que devem combinar atividades catalíticas específicas para o processamento de proteínas do vírus e/ou do hospedeiro para permitir a replicação viral com a eficiência, ao ser codificada por um genoma extremamente reduzido.

HIV-1 Protease: o principal exemplo do sucesso do desenho de fármacos baseado na estrutura

A identificação dos eventos moleculares críticos para a replicação do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) permitiu a seleção de algumas estratégias para intervenção quimioterápica potencial (Cann & Karn, 1989; Mitsuya et al., 1990), entre essas o bloqueio da protease viral codificada (Huff, 1991). Na busca por um agente antiviral eficiente, tornou-se imperativo classificar as proteases. Parte da classificação começou por comparação computacional das seqüências retrovirais com seqüências de proteases celulares sugerindo que as proteases retrovirais seriam membros da família das aspártico proteases (Toh et al., 1985). Um mistério era, no entanto, o fato das proteinases retrovirais serem consideravelmente menores que as enzimas pepsina-símeis, tendo menos que 130 aminoácidos de comprimento. Uma modelagem computacional brilhante por Pearl & Taylor (1987), combinando os dois monômeros de 99 aminoácidos, enovelados identicamente, da protease do HIV em um homodímero (cada um contribuindo com um motivo Asp-Thr-Gly), formando então a cavidade do sítio ativo, forneceu o caminho para a elucidação final (Figura 1). Interessante como este trabalho, aliado aos dados experimentais que se seguiram, comprovando a estrutura dimerica da HIV-1 protease (Graves et al., 1990; Schneider & Kent, 1988; Wlodawer et al., 1989), reforçam a proposição feita por Tang et al. (1978), baseados na estrutura bilobada das proteinases áci-

das de fungos, de que as aspártico proteases teriam evoluído a partir da duplicação / fusão de um gene ancestral que codificaria um dos lóbulos das enzimas pepsina-símil e subsequente evolução divergente de cada uma das subunidades.

O vasto conhecimento já existente sobre a estrutura das aspártico proteases digestivas (p.ex.: pepsina), de fungos (endothiapepsina, rhizopuspepsina e pnicillopepsina) e envolvidas no sistema cardiovascular (renina) proporcionaram a informação de entrada necessária aos estudos de modelagem molecular, utilizados para desenvolver os inibidores de HIV-1 protease atuais. As aspártico proteinases perfazem uma classe de enzimas amplamente distribuída, sendo encontrada em vertebrados, fungos, plantas e, mais recentemente, em retrovírus (Davies, 1990). São caracterizadas, geralmente, por apresentarem um pH ótimo ácido; serem inibidas pela pepstatina (um hexapeptídeo de *Streptomyces sp.*) e pelo 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi)propano (EPNP; um marcador da presença de resíduos de ácido aspártico do sítio ativo) e pela especificidade por substratos peptídicos estendidos. Estas enzimas possuem seqüências características na região dos dois resíduos catalíticos de ácido aspártico: (hidrofóbico, geralmente Phe)-Asp³²-Thr-Gly-Ser, no domínio N-terminal e um domínio C-terminal correspondente (hidrofóbico)-Asp²¹⁵-Thr-Gly-Ser/Thr (numeração conforme a pepsina). A estrutura geral dos membros desta família consiste, quase inteiramente, de uma folha beta-pregueada, com pouquíssimas α -hélices. A molécula é bilobada com dois domínios de estrutura similar relacionados por um eixo de simetria. Uma ampla fenda de, aproximadamente, 40 Å, atravessa inteiramente a molécula e separa os dois domínios. Sob estes, uma extensa folha β -pregueada de seis fitas forma a base da molécula. A HIV protease possui esta mesma estrutura β -pregueada típica, porém apresenta quatro fitas interdigitantes ao invés de seis. Os resíduos de ácido aspártico catalíticos estão localizados nos terminos das alças em formato da letra grega psi (ψ), que estendem-se de cada domínio e estão relacionadas umas às outras por um eixo de pseudo simetria. Os dois grupos carboxílicos no sítio ativo estão conectados por uma complexa rede de pontes de hidrogênio que faz uso da

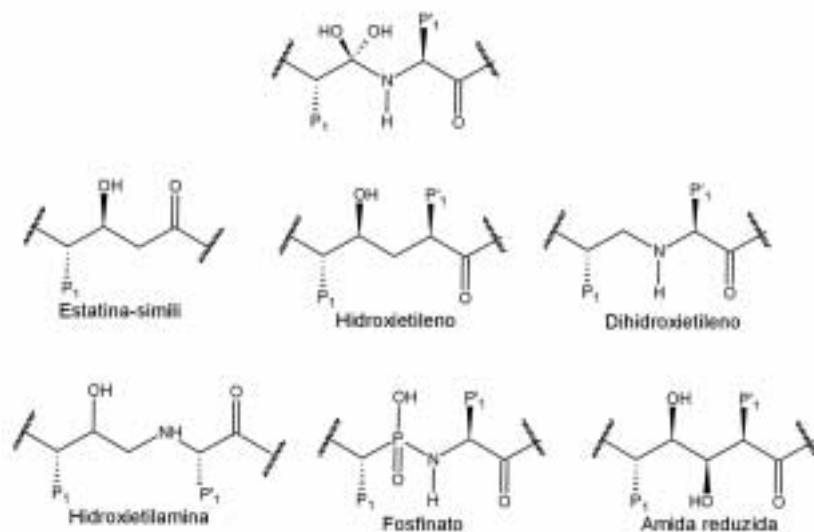


Figura 3: Isósteros de estado de transição que mimetizam o intermediário tetraédrico formado na hidrólise do peptídeo

seqüência Asp-Thr-Gly (Figura 2). As duas treoninas desempenham um papel crucial. Os grupos hidroxílicos de cada uma formam pontes de hidrogênio com o nitrogênio presente na função amida da outra. Estas também estão em distância apropriada para formar pontes de hidrogênio com os oxigênios carbonílicos dos dois resíduos hidrofóbicos precedendo os aspárticos catalíticos. Era esperado que essa rede de pontes de hidrogênio tornasse a região do sítio ativo da enzima bem rígida e os baixos fatores B cristalográficos observados nesta região confirmam esse fato. Uma exceção é o *flap*, que, na enzima nativa possui um alto fator B, indicando alta mobilidade. Este último consiste em uma alça em forma de grampo de cabelo (*hairpin loop*), que se projeta sobre a fenda do sítio ativo. Diferentemente das aspártico proteases de mamíferos e fungos, que apresentam somente um *flap*, a protease do HIV-1 apresenta duas destas estruturas. Esta região fecha-se sobre inibidores ligados na fenda, incluindo mais ainda o solvente e tornando-se consideravelmente menos móveis. A análise de inibidores ligados às proteinases fúngicas forneceu a base para a modelagem do substrato, o que por sua vez pôde levar a uma avaliação de possíveis mecanismos de ação em termos tridimensionais. Uma propriedade característica da hidrólise peptídica realizada por aspártico-proteinases é a especificidade por subsítios estendidos em

cada um dos lados da ligação lábil. O número de resíduos da enzima envolvido em cada posição do subsítio varia com o tamanho da cadeia lateral do substrato-inibidor e com o critério usado para definir um resíduo fazendo contato, mas contato extensivo é feito com todos os seis subsítios. As bolsas de ligação de cada resíduo do substrato, até quatro do lado N-terminal da ligação lábil e duas do lado C-terminal já foram descritas para a penicillopepsina. A maioria dos autores acredita que a clivagem da ligação peptídica mediada por estas enzimas, provavelmente, se passa por uma catálise básica geral, na qual o complexo carboxilato ativo uma molécula de água ubíqua existente no sítio ativo (Davies, 1990).

A abordagem para o desenvolvimento de inibidores enzimáticos tem envolvido vários métodos. Por exemplo, o conhecimento de que a HIV-1 protease pertencia à classe aspártico levou pesquisadores a testarem inibidores de outras enzimas da mesma classe como inibidores de proteases retrovirais. Usando esta abordagem, muitos grupos identificaram inibidores da renina ativos contra a HIV-1 protease e muitos destes compostos foram subsequentemente desenvolvidos em inibidores potentes e seletivos. Entretanto, quando o objetivo é desenvolver inibidores baseados na estrutura de uma nova enzima proteolítica, a questão inicial a explorar é a seqüência e o tamanho mínimo do substrato. A espe-

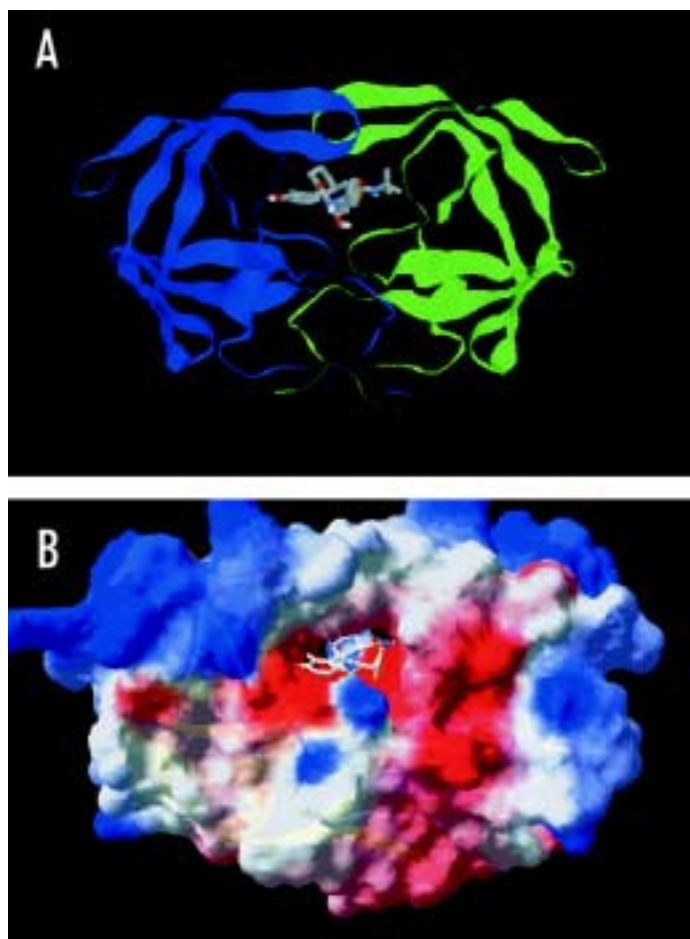
cificidade de substrato da protease do HIV representa uma situação paradoxal, na qual a enzima é requerida para realizar uma série de clivagens altamente específicas nas poliproteínas *gag-pol* em sítios contendo seqüências marcadamente heterogêneas (Huff, 1991). A observação da ocorrência freqüente de um sítio de clivagem (Aromático)-Pro em 19 retrovírus foi fundamental para o desenvolvimento dos inibidores atuais, pois a hidrólise de uma prolina N-terminal não é usual em endopeptidases de mamíferos. Tyr-Pro ou Phe-Pro compreendem os resíduos P1-P1' em três dos sítios de processamento do HIV-1 [notação de Schester & Berger (1967), na qual resíduos do substrato são numerados a partir da ligação lábil, P₁-P_n no lado N-terminal e P'₁-P'_n no lado C-terminal]. Uma vez isso conhecido, foi possível desenhar inibidores, baseados neste substrato mínimo. A estratégia usual empregada é substituir a ligação lábil do substrato por análogos de estado de transição não hidrolisáveis para mimetizar esta ligação (Figura 3). Estas unidades são mímicos dipeptídicos para o intermediário tetraédrico que ocorre durante a hidrólise da ligação peptídica. A maioria dos potentes inibidores de HIV protease existentes hoje são peptidomiméticos baseados neste conceito (Vacca, 1994). Um segundo fator importante para o desenho de inibidores peptidomiméticos da HIV-1 protease foi a estrutura simétrica C₂ ativa do homodímero da enzima. Sob o argumento de que estruturas que refletem o sítio ativo simétrico da enzima podem provar ser benéficos em termos de novidade, potência e seletividade, uma série de inibidores simétricos-C₂ foram desenhados. Essa estratégia baseia-se na duplicação da porção de um substrato/inibidor assimétrico, que ocupa uma metade do sítio ativo pela aplicação de uma operação de simetria C₂, que irá produzir uma estrutura simétrica capaz de parear as regi-

ões hidrofílicas e hidrofóbicas de ambas as metades do sítio ativo (Kempf, 1994). As duas metades idênticas da unidade básica são atracadas ao centro por uma função capaz de formar pontes de hidrogênio com o aspartato catalítico da enzima, uma propriedade estrutural demonstrada como essencial para a alta potência de inibidores prévios da HIV protease. Dependendo da escolha do eixo, do término a ser duplicado e da identidade da função central formadora de ponte de hidrogênio, unidades básicas diversas de inibidores podem ser concebidas por este método.

Um fator importante que influenciou o desenho de inibidores de HIV protease foi a ampla disponibilidade de estruturas cristalográficas de ambas as proteases nativas e complexadas (Figura 4).

Figura 4: Complexo HIV protease-AG-1343

(Viracept®)³⁹. A- AG-1343 ancorado no sítio ativo da protease, que foi representada na forma de fitas, e colorida diferentemente para cada monômero. B- Mesma visão que A, porém mostrando a superfície molecular da proteína colorida conforme seu potencial eletrostático. Vermelho – negativo, azul – positivo, branco – neutro



ra 4). Apesar da diversidade das estruturas dos inibidores e diferenças na simetria do cristal, alguns atributos comuns do complexo HIV-1 protease inibidor emergiram. Somente uma leve reorganização do cerne da enzima foi observada após a ligação do inibidor, onde a porção da estrutura que mostrou uma movimentação significativa foi a região do *flap*, com a ponta das alças movendo-se 7 Å (Huff, 1991). Esta informação foi importante para o planejamento dos ensaios de simulação computacional do ancoramento de inibidores no sítio ativo da protease. Em sua conformação contraída, os *flaps* formam a face superior de uma fenda tubular hidrofóbica, estendendo-se aproximadamente de P₃ até P'₃ protegendo, dessa forma, 80% do inibidor ligado do solvente circunvizinho (Figura 5A). Diferentemente das aspártico-proteases de mamíferos e de fungos, que promovem o contato entre inibidores ligados e resíduos, estendendo-se a partir da face de seu *flap* único, a protease do HIV faz contato com inibidores ao longo da borda de cada um dos seus *flaps*. Uma propriedade marcante de todos os complexos de inibidores é uma molécula de água fortemente ligada, que faz uma ponte entre os dois *flaps* da enzima e o inibidor, através de pontes de hidrogênio formadas pelos nitrogênios de amida de Ile⁵⁰ e Ile²⁵⁰ e os oxigênios carbonílicos de P₂ e P'₁. Os inibidores ligam-se em uma conformação estendida de P₄ a P'₃ (Figura 5B). Uma extensa rede de pontes de hidrogênio é observada entre a enzima e os átomos polares nos inibidores (Figura 5C). As paredes hidrofóbicas da fenda de ligação mostram extensos contatos de van der Waals com as cadeias laterais dos inibidores (Figura 5D).

Portanto, a habilidade de utilizar informações estruturais para a otimização de um inibidor existente ou para o desenho de ligantes não peptídicos através de métodos computacionais terá impacto significativo no desenho de

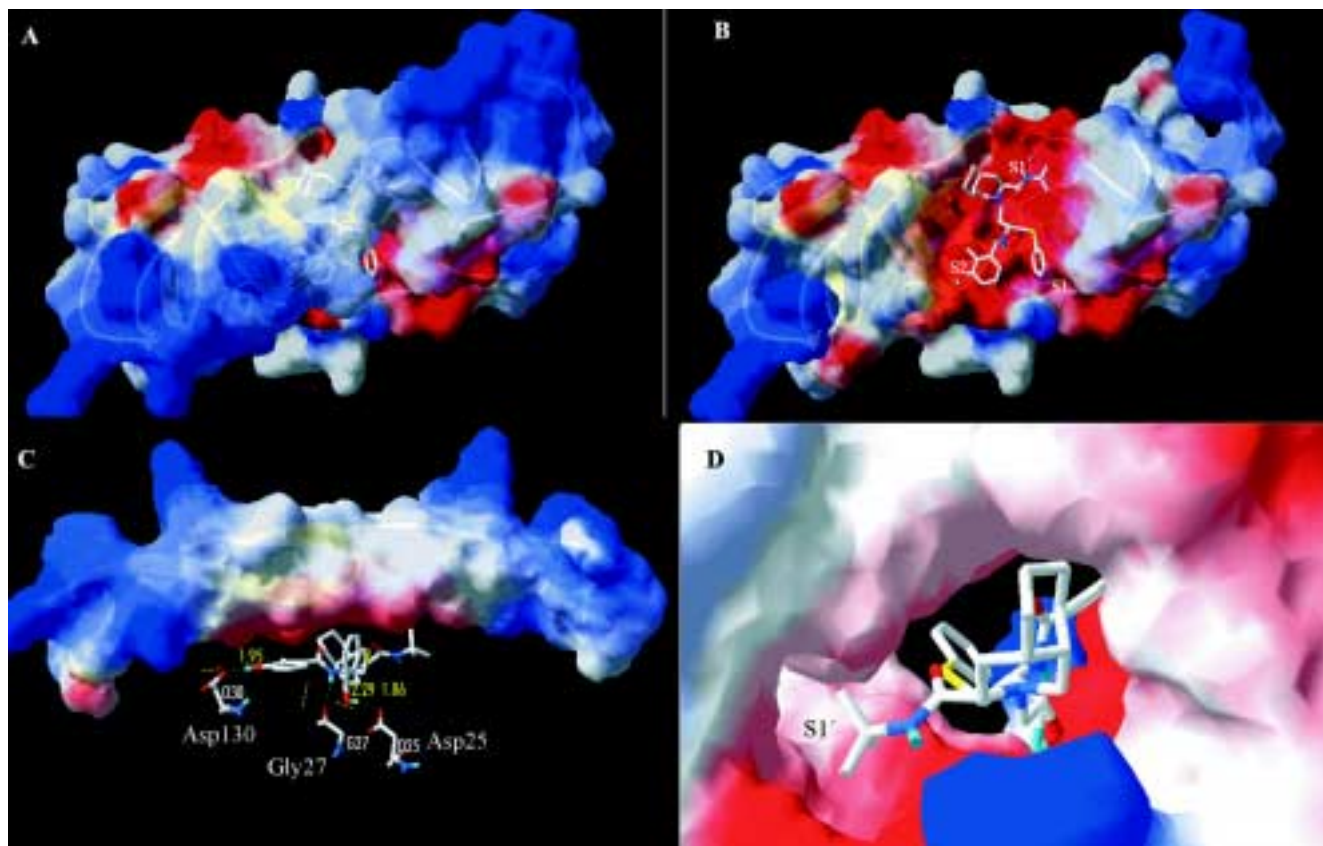


Figura 5: Interação de AG-1343 (Viracept®) com a protease do HIV-1. A estratégia de desenvolvimento de AG-1343, que se baseou na combinação de desenho baseado em estrutura (*structure-based drug design*) e análise dos perfis farmacocinéticos e de atividade antiviral do fármaco. A- Visão com o eixo de simetria diadal perpendicular ao plano da página, mostrando a região de flap encobrindo o inibidor. B- A região de flap foi extraída para permitir a observação da interação dos grupos tiofenil (P_1), fenolamido (P_2) e T-butilperidroisoquinolina (P_3) com os subsítios da enzima. C- Visão com o eixo de simetria diadal no plano da página. A estrutura do complexo revela como os substituintes tiofenil éter e fenolamida, deste inibidor não peptídico, interagem com os subsítios S_1 e S_2 da enzima, respectivamente.

inibidores futuros da HIV-1 e demais proteases alvos para quimioterapia.

Proteases sob investigação e Perspectivas no estudo destas enzimas como potenciais alvos para quimioterapia

As vantagens de se concentrar em proteases como alvos para quimioterapia são evidentes (Southan, 2001). A inibição seletiva de proteases de mamíferos que se tornam aberrantemente expressas ou desreguladas durante doenças é uma importante meta no desenvolvimento e desenho de novos fármacos. As principais razões para este interesse incluem os dados acumulados na enzimologia, bioquímica, fisiologia, estrutura 3D e mecanismo de inibição destas enzimas. Além disso, há uma substancial quantidade de informações sobre o desenvolvimento de

inibidores de proteases de vírus que apresentam uma extensiva sobreposição metodológica com as proteases humanas. O número de proteases humanas sob investigação como alvos para drogas aproximadamente dobrou entre 1998 e 2000. Atualmente, 14 % das proteases humanas são investigadas como alvos potenciais para quimioterapia, incluindo: Caspase-3 (cisteína proteinase) na isquemia cerebral (Lotscher *et al.*, 2001), TACE (enzima conversora do fator de necrose tumoral; metaloprotease) na artrite, câncer e diabetes (Moss *et al.*, 2001), metaloproteases da matriz no câncer (Foda & Zucker, 2001) e catepsina D na doença de Alzheimer (Papassotiropoulos *et al.*, 2001), só para citar alguns exemplos mais recentes. O projeto genoma humano certamente teve participação cru-

cial neste aumento recente de alvos disponíveis. Uma anotação preliminar do genoma humano mostrou a existência de 498 seqüências codificando proteases (1,6 % do total de proteínas preditas), superando outras classes tradicionais de proteínas exploradas pela indústria farmacêutica, como as proteínas-quinases (437), receptores acoplados à proteína G (369) e receptores de esteróides (35) (Southan, 2001).

A inibição seletiva de proteases microbianas atuando nas células ou no espaço extracelular do hospedeiro trata-se de estratégia interessante no combate de infecções por diversos tipos de microorganismos, pois retarda as taxas de replicação destes organismos invasores e assim assiste os mecanismos imunológicos de defesa envolvidos em sua erradicação. Entre as doenças in-

fecciosas que apresentam proteases microbianas que estão sendo investigadas como alvos para quimioterapia estão: esquistossomose (aspártico proteinase; Wong *et al.*, 1997), candidíase (aspártico proteinase; Hoegl *et al.*, 1996), malária (aspártico proteinase; Carroll *et al.*, 1998) e outras parasitoses (cisteína proteinases; McKerrow, 1999). Recentemente, foi proposto que a inibição de enzimas da classe das serino, cisteína e metalo proteases poderia ser utilizada no combate de infecções causadas por bactérias de diversas espécies (Travis & Potempa 2000), como, por exemplo, *Clostridium sp.*, *E. coli*, e *P. aeruginosa*, somente para citar alguns dos patógenos mais conhecidos.

Atualmente, tem sido investigado o papel da região pré-pró de zimogênios de proteases como inibidores naturais específicos destas enzimas (Khan *et al.*, 1999). Este tipo de inibição parece envolver mecanismos diferentes dos apresentados pelos inibidores existentes, baseados na ligação sob conformação estendida no sítio ativo de proteases (Tyndall & Fairlie, 1999). Uma outra possibilidade de atuação encontrada, envolve o desenvolvimento de inibidores da associação das cadeias polipeptídicas durante a síntese da protease. Este tipo de inibição tem sido denominada de inibição dissociativa, e é diferente das descritas anteriormente. Estas questões, assim como diversos aspectos do envolvimento de proteases na infecção por *Leishmania sp* e *T. cruzi*, têm sido explorados por nosso laboratório para a síntese de novos inibidores peptidomiméticos.

Portanto, o estudo de proteases ainda tem muito a revelar e o uso da modelagem molecular para o desenho de inibidores cada vez mais potentes e seletivos certamente contribuirá para a descoberta de novas abordagens terapêuticas para muitas das doenças que afligem o homem.

Referências:

- 1- CANN AJ & KARN J. Molecular biology of HIV: new insights into the virus life-cycle, **AIDS**, 3(suppl. 1): S19-S34, 1989.
- 2- CARROLL CD, JOHNSON TO, TAO S LAURI G, ORLOWSKI M, GLUZMAN HY, GOLDBERG DE & DOLLE RE. Evaluation of a structure-based statine cyclic diamino amide encoded combinatorial library against plasmepsin II

and cathepsin D, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 8: 3203-6, 1998.

- 3- DAVIES DR. The structure and function of the aspartic proteinases, **Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.**, 19: 189-215, 1990

- 4- FODA HD & ZUCKER S (2001). Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis, **Drug Discov. Today**, 6(9): 478-482.

- 5- GRAVES MC, MEIDEL MC, PAN Y-CE, MANNEBERG M, LAHM H-W & GRÜNINGER-LEITCH F. Identification of a human immunodeficiency virus-1 protease cleavage site within the 66000 Dalton sbunit of reverse transcriptase, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 168: 30-36, 1990.

- 6- HOEGL L, OLLERT M & KORTING HC. The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidoses, **J. Mol. Med.**, 74: 135-142, 1996.

- 7- HUFF JR. HIV Protease: A Novel Chemotherapeutic Target for AIDS, **J. Med. Chem.**, 34(8): 2305-2314, 1991.

- 8- KALDOR SW, KALISH VJ, DAVIES II JF, SHETTY BV, FRITZ JE, APPELT K, BURGESS JA, CAMPANALE KM, CHIRGADZENY, CLAWSON DK, DRESSMAN BA, HATCH SD, KHALIL DA, KOSA MB, LUBBEHUSEN PP, MUESING MA, PATICK AK, REICH SH, SU KS, TATLOCK JH. Viracept (Nelfinavir Mesylate, AG1343): a potent, orally bioavailable inhibitor of HIV-1 protease, **J. Med. Chem.**, 40: 3979, 1997.

- 9- KEMPF DL. Design of Symmetry-based, peptidomimetic inhibitors of human immunodeficiency virus protease, **Meth. Enzymol.**, 241: 334-355, 1994.

- 10- KHAN AR, BERNSTEIN NK-, BERGMANN EM & JAMES MNG. Structural aspects of activation pathways of aspartic protease zymogens and viral 3C protease precursors, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 96: 10968-75, 1999.

- 11- LOETSCHER H, NIEDERHAUSER O, KEMP J & GILL R. Inhibition of caspase-3 inhibition: a novel therapeutic strategy in cerebral ischemia, **Drug Discov. Today**, 6(13): 671-80, 2001.

- 12- MCKERROW JH, ENGEL JC & CAFFREY CR. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections, **Bioorg. Med. Chem.**, 7: 639-44, 1999.

- 13- MITSUYA H, YARCHOAN R & BRODER S. Molecular targets for AIDS therapy, **Science**, 249: 1533-1544, 1990.

- 14- MOSS ML, WHITE JM, LAM-

BERT MH & ANDREWS RC. TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery, **Drug Discov. Today**, 6(8): 417-426, 2001.

- 15- PAPANASTASIIOPOULOS A, BAGLI M, KURZ A, KORNUBER J, FÖRST H, MAIER W, PAULS J, LAUTENSCHLAGER N & HEUN R. A genetic variation of cathepsin D is a major risk factor for Alzheimer's disease, **Ann. Neurol.**, 47: 399-403, 2000.

- 16- PEARL LH & TAYLOR WR. A structural model for the retroviral proteases, **Nature**, 329: 351-354, 1987.

- 17- RAWLINGS ND & BARRET AJ. MEROPS: The Peptidase database, **Nucleic Acids Res.**, 28(1): 323-325, 2000.

- 18- SCHESTER I & BERGER A. On the size of the active site in proteases. I. Papain, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 27: 157-162, 1967.

- 19- SCHNEIDER J & KENT SBH. Enzymatic activity of a synthetic 99 residue protein corresponding to the putative HIV-1 protease, **Cell**, 54: 363-368, 1988.

- 20- SOUTHAN C. A genomic perspective on human proteases as drug targets. **Drug Discov. Today**, 6(13): 681-688, 2001.

- 21- TANG J, JAMES MNG, HSU N, JENKINS JA & BLUNDELL TL. Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases, **Nature**, 271: 618-21, 1978.

- 22- TOH H, ONO M, SAIGO K AND MIYATA T. Retroviral protease-like sequence in the yeast transposon Ty1, **Nature**, 315, 691-692, 1985.

- 23- TRAVIS J & POTEPA J. Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics, **Biochim. Biophys. Acta**, 1477: 35-50, 2000.

- 24- TYNDALL JDA & FAIRLIE DP. Conformational homogeneity in molecular recognition by proteolytic enzymes, **J. Mol. Recognit.**, 12: 363-370, 1999.

- 25- VACCA JP. Design of tight-binding human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors, **Meth. Enzymol.**, 241: 311-334, 1994.

- 26- WLODAWER A, MILLER M, JASKOLSKI M, SATHYANARAYANA BK, BALDWIN E, EBERIT, SELK L, CLAWSON L, SCHNEIDER J & KENT SBH. Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease, **Science**, 245: 616-621, 1989.

- 27- WONG, JYM, HARROP S, DAY SR & BRINDLEY PJ. Schistosomes express two forms of Cathepsin D, **Biochim. Biophys. Acta**, 1338: 156-160, 1997.