

Micro y nano-biotecnologías en la detección y caracterización de inhibidores de proteasas de interés biomédico

R. García-Fernández, E. Salas, A. del Monte, M. Alonso del Rivero, Y. Guerra, M. A. Chávez[†].

Centro de Estudios de Proteínas (CEP). Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Calle 25 No. 455, Vedado, CP 10400, Ciudad de La Habana, Cuba; mchavez@infomed.sld.cu

[†]autor para la correspondencia

Recibido el 9/04/2009. Aprobado en versión final el 20/06/2009.

Sumario. Los inhibidores de proteasas constituyen herramientas importantes en la biomedicina, la biotecnología y el diagnóstico. Varias metodologías micro- y nanobiotecnológicas, basadas en la inmovilización de biomoléculas en superficies sólidas, han permitido la identificación de inhibidores de proteasas en extractos naturales, y su posterior caracterización. Se destacan la atenuación de la intensidad de la señal de espectrometría de masas y la resonancia superficial de plasmones. Su empleo, combinado con métodos tradicionales como la difracción de rayos-X y la dispersión dinámica de la luz, también permite conocer detalles de los complejos proteasa-inhibidor a escala nanométrica.

Abstract. Protease inhibitors have a great importance in biomedicine, diagnostic and biotechnology. Some micro- and nanotechnologies, such as intensity fading mass spectrometry and plasmon surface resonance, have allowed identification and further characterization of natural protease inhibitors. Their combination with dynamic light scattering and X-ray crystallography, allows obtaining nanometric details of protease-inhibitor complexes.

Palabras clave. Nanotechnology biomedical applications, 87.85.Qr, 87.85.Rs, 81.16.-c

1 Introducción

La nanobiotecnología, disciplina en la frontera entre la nanotecnología y la biotecnología, permite estudiar nanoestructuras funcionales inherentes a los seres vivos, por ejemplo las proteínas. Su empleo en la identificación, cuantificación y caracterización de la función y el plegamiento de las proteínas, ha posibilitado avances en el diagnóstico y la terapéutica de múltiples enfermedades^{1,2}. Por otra parte, el desarrollo de la Genómica y la Proteómica, también ha contribuido al desarrollo de la nanobiotecnología, debido a la posibilidad de identificar nuevas proteínas diana presentes en pequeñas cantidades en mezclas complejas de tejidos y fluidos biológicos³.

Entre las dianas terapéuticas más atractivas, se encuentran las proteasas, que catalizan la ruptura de los enlaces peptídicos, actividad necesaria en todo el ciclo de vida de un organismo vivo^{4,6}. Sus contrapartes moleculares, los inhibidores de proteasas (IP), constituyen reguladores endógenos de la actividad proteolítica. Esta actividad ha motivado su uso en la biotecnología y en el diagnóstico o terapéutica de enfermedades tan diversas como el cáncer y el Alzheimer, enfermedades inmunológicas, inflamatorias, cardiovasculares y respiratorias e infecciones parasitarias, fúngicas y virales, como la malaria, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), las Hepatitis, entre otras⁶.

Entre las metodologías micro- y nanobiotecnológicas utilizadas para el estudio de IP, se destacan las que se

basan en la inmovilización de biomoléculas en superficies sólidas. Ejemplos de estas metodologías son la resonancia superficial de plasmones (BIAcore)⁹ y la atenuación de la intensidad de la señal de espectrometría de masas (IF MALDI-TOF MS)^{10,11}, útiles para caracterizar las propiedades funcionales de los IP y las proteasas. También se han desarrollado nuevos métodos más eficientes de nano-cristalización de proteínas, para dilucidar su estructura tridimensional (3D), que permiten obtener cristales a partir de volúmenes pequeños de muestras en el orden de las decenas de nanolitros. Estas nuevas metodologías pueden complementarse con métodos tradicionales como la difracción de rayos-X (DRX)¹² y la dispersión dinámica de la luz (DLS), técnica que permite determinar el radio hidrodinámico (Rh) de nanopartículas de diferente naturaleza en un intervalo de 1-1000 nm¹³. Por su parte, la DRX permite caracterizar la función y el plegamiento o estructura 3D de las proteínas y de complejos macromoleculares, como es el caso de los complejos proteasas:IP^{12,14}.

En el presente artículo se describe el empleo de BIAcore e IF MALDI-TOF MS, en la identificación y caracterización de IP de importancia terapéutica y diagnóstica, a partir de su fuente natural. También se describe el uso de DLS y DRX como herramientas complementarias para la caracterización de estas nanopartículas y sus complejos con proteasas dianas.

2 Micro y nanobiotecnologías para la identificación y caracterización de IP

Inmovilización de biomoléculas en superficies sólidas. La inmovilización es el término tradicional empleado para describir la metodología de fijación o atrapamiento de una biomolécula en una superficie sólida y generalmente insoluble. También puede definirse como la localización de las biomoléculas en una fase, con retención de su actividad funcional, y la posibilidad de ser utilizada de manera continua y repetitiva¹⁵. Esta metodología es útil en procesos industriales y biotecnológicos de bioconversión así como en la Biomedicina^{15,16}. En los últimos años se ha logrado reducir la escala operacional de estas metodologías hasta 5-10 micrómetros y se han diseñado nuevos prototipos de biomoléculas inmovilizadas en partículas nanométricas. Por otra parte, la utilización de estas micro- o nanoestructuras con fines terapéuticos, permite disminuir la antigenicidad de los fármacos y mejorar su distribución o direccionalización en el organismo².

El tipo de micro- o nanopartícula, el método de obtención y el grado de inmovilización (GI) se seleccionan de acuerdo al ligando, el analito, la fortaleza de su interacción y la posterior aplicación de la partícula¹⁶. En general, se recomiendan valores de la constante de equilibrio de disociación (K_D) de las moléculas interactuantes entre 10^{-4} - 10^{-8} M, para lograr su uso continuo y repetitivo. En el caso de los IP endógenos, con valores de constante de inhibición (K_i) $\leq 10^{-8}$ M, el GI debe ser bajo,

(2-7 pg/ ng de superficie) para disminuir los impedimentos estéricos y las interacciones inespecíficas^{15,16}.

El diseño de matrices de afinidad con este tipo de micro- o nanopartículas, también permite la captura selectiva de biomoléculas, lo que aumenta la resolución y el rendimiento de la purificación y ahorra tiempo y recursos. Esto es especialmente importante en IP y otras proteínas con potencialidades terapéuticas, las que requieren de un alto grado de homogeneidad¹⁷.

Para optimizar la inmovilización de proteasas e IP, nuestro Laboratorio ha desarrollado una estrategia de diseño racional que permite calcular la densidad de grupos reactivos que pueden interactuar con la proteína en la superficie sólida, minimizar los impedimentos estéricos y estimar la cantidad máxima teórica de proteína por unidad de superficie. Esta predicción *in silico* permite predecir las características más importantes de la partícula y ahorra recursos y tiempo de experimentación¹⁸. Esta estrategia, ejemplo de convergencia de las micro- y nanotecnologías, la biotecnología y la informática, ha permitido inmovilizar por primera vez, varias proteasas dianas. La posterior identificación y purificación de IP frente a estas enzimas, pudiera contribuir al diagnóstico o terapéutica de enfermedades, entre las que se encuentra, la malaria^{17,19,20}.

Aplicaciones de la inmovilización en la identificación y caracterización de IP

Métodos proteómicos. La atenuación de la intensidad de la señal de espectrometría de masas con el método de ionización asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo (IF MALDI-TOF MS: del inglés “intensity fading”, “matrix-assisted laser desorption ionization”, “time of flight”, “mass spectrometry”) posibilita detectar la formación de complejos entre moléculas, particularmente proteínas, mediante la utilización de la espectrometría de masas como transductor^{10,11}.

El método fue desarrollado para identificar IP a partir de mezclas naturales complejas mediante su capacidad de interacción con las proteasas que inhibe¹⁰. La formación del complejo se detecta mediante la atenuación o apagamiento de la intensidad iónica molecular de una proteína, después de adicionar su contraparte molecular, cuando se compara con un espectro de masas control de la muestra inicial¹⁰. Una variante desarrollada posteriormente, incluye una etapa de afinidad con la proteasa inmovilizada en micropartículas poliméricas¹¹. El inhibidor retenido en la micropartícula puede ser eluido selectivamente y analizado mediante espectrometría de masas^{11,21}. De esta forma, la reaparición o el aumento de la intensidad de la señal en el espectro de la fracción eluida, corrobora la presencia de una molécula capaz de interactuar con la proteasa inmovilizada y descarta la posibilidad de interacciones inespecíficas (Figura 1).

Esta metodología ha permitido identificar IP en extractos heterogéneos de invertebrados marinos. Por ejemplo, la interacción del extracto del anélido marino *Sabellastarte magnifica* con carboxipeptidasa A (CPA), produjo la disminución de una señal correspondiente a

20 kDa (Fig. 1). La posterior elución de los componentes retenidos, sugirió la presencia en el extracto de un in-

hibidor de CPA con una masa molecular de 20 kDa, que fue posteriormente purificado y caracterizado²¹.

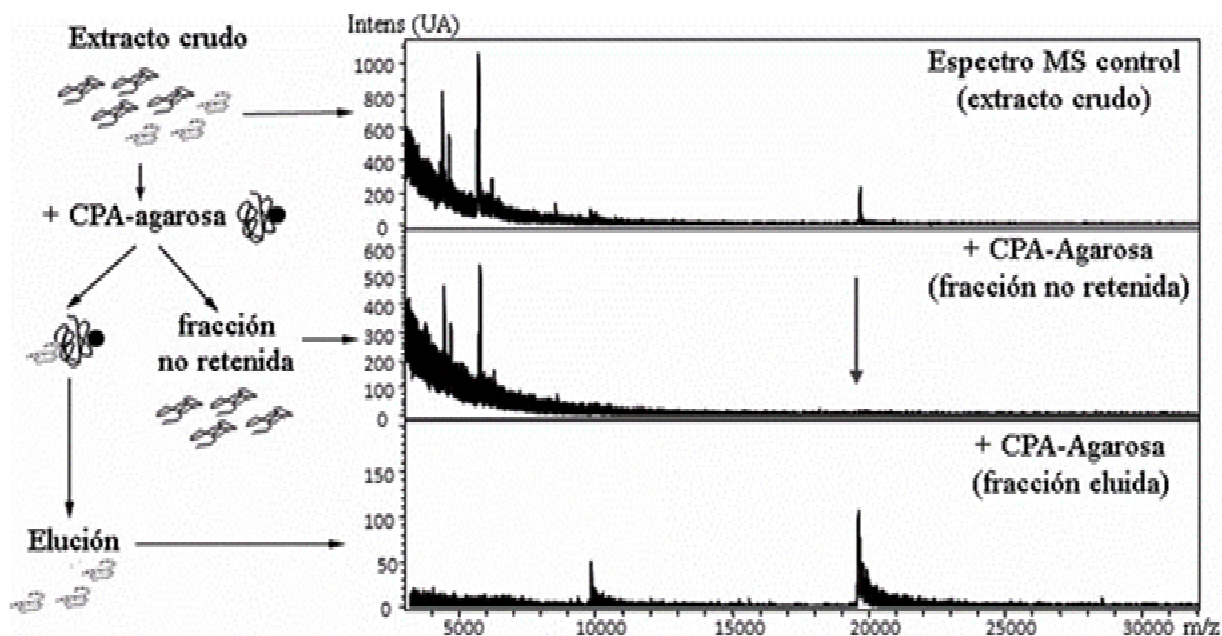


Figura 1. Izquierda: estrategia general de identificación de IP a partir de mezclas complejas mediante IF MALDI-TOF MS. El círculo negro representa la partícula de agarosa donde se inmoviliza la enzima. Derecha: Identificación de actividad inhibitoria de CPA en el extracto de *S. magnifica*. La interacción con la enzima (pH 5 y temperatura ambiente) provoca la desaparición de la señal iónica con $m/z \sim 20$ kDa presente en el extracto crudo (ver flecha), que reaparece al eluir con 0.1% TFA, pH 1.

Esta metodología también permite caracterizar el espectro de actividades inhibitorias de IP previamente purificados. Por ejemplo, el estudio mediante IF MALDI TOF, del inhibidor recombinante ShPI-1, indicó que éste mantiene las principales características funcionales del inhibidor natural, obtenido de la anémone de mar *Stichodactyla helianthus*. La molécula natural interactúa con proteasas de tipo serino (tripsina) y aspártico (pepsina) y constituye el primer IP descrito activo frente a proteasas de tres clases mecánicas diferentes, propiedad que le confiere ventajas para su uso biotecnológico y diagnóstico^{22,23}.

Por otra parte, se ha demostrado que la intensidad relativa de la señal iónica del IP, en función de las concentraciones de la enzima diana, responde a un comportamiento cinético típico de estas moléculas. Este resultado posibilita clasificar *a priori* los IP en base a su fortaleza de interacción, a escala semicuantitativa. Por lo tanto, la metodología IF MALDI-TOF MS complementa los ensayos cinéticos tradicionales y confirma la presencia de IP capaces de interactuar con sus proteasas diana. El conocimiento de las masas moleculares de los IP detectados, facilita su purificación y caracterización. Es posible, además, realizar la detección en un intervalo amplio de masas moleculares y no existe límite de masa para la molécula diana. Otras ventajas están relacionadas con su rapidez y sensibilidad (detección de muestra en el intervalo sub-micromolar) y la posibilidad de su integración a un

formato de alto flujo.

Métodos de interacción en tiempo real. El estudio de las interacciones moleculares –asistido por tecnología basada en el fenómeno físico de Resonancia de Plasmones de Superficie– se realiza en un *sensor chip*, cuya superficie combina una alta capacidad de unión, reproducibilidad en las medidas y resistencia química⁹. A pesar de que existen *bioships* de diversos formatos, el más empleado es el Biacore (Biacore AB), en el que una molécula (ligando) se inmoviliza en una superficie de oro, recubierta por cadenas de carboximetildextrano. Posteriormente, su contraparte molecular (analito) se inyecta a flujo continuo sobre la superficie derivatizada. Como resultado de la interacción, ocurre un aumento de la densidad de masa en la superficie, lo que genera un cambio del índice de refracción en la vecindad del *bio-chip*. Este fenómeno es transducido en tiempo real por el sistema óptico acoplado al sensor, que genera un perfil continuo de la unión (sensograma). En la fase inicial del experimento, la forma del sensograma refleja la producción simultánea de los procesos de asociación-disociación. En la fase final (cuando circula solución libre de analito) el sensograma representa solo el proceso de disociación (Fig. 2 arriba). Para eliminar los efectos inespecíficos, el analito se inyecta en paralelo a través de una superficie control virgen (o derivatizada con otro ligando) y el sensograma control es sustraído del sensograma original^{9,24}.

Cuando se aplica al estudio de sistemas proteasa (ligando)-inhibidor (analito), esta herramienta puede suministrar dos tipos de información. Primeramente, el análisis de la forma del sensograma puede demostrar la presencia de (uno o más) compuestos capaces de interactuar específicamente con la proteasa inmovilizada²⁵. Además, si se conoce la relación estequiométrica del complejo y la cantidad de enzima activa inmovilizada en el biochip, es posible estimar la masa molecular del inhibidor y su concentración²⁴. En segundo lugar, es posible seguir el curso temporal de los procesos de asociación/disociación y obtener información cinética de estos fenómenos. Para esto es necesario obtener sensogramas sucesivos, mediante la inyección de soluciones con concentraciones crecientes del inhibidor (Fig. 3 abajo). Este procedimiento permite calcular las constantes cinéticas de asociación (k_{as}) y disociación (k_{dis}), así como la constante de equilibrio de disociación del complejo proteasa-inhibidor (K_i), mediante el ajuste de los datos obtenidos a modelos matemáticos²⁵. De esta forma, es posible seleccionar los IP más prometedores atendiendo a diferentes parámetros cinéticos. Además de la K_i , que refleja la fortaleza de la inhibición, resulta muy informativo el valor de k_{dis} , que es proporcional a la estabilidad temporal del complejo enzima-inhibidor y por tanto, podría ser indicativo de efectos más prolongados *in vivo*²⁵.

La tecnología BIAcore se ha empleado en la selección y caracterización de IP sintéticos contra la proteasa aspártica del VIH²⁵ y las proteasas ácidas secretadas por *Candida albicans*²⁶. También, en la búsqueda y caracterización funcional de IP a partir de fuentes naturales, frente a enzimas dianas de diversas clases mecanísticas. Por ejemplo, se ha realizado la búsqueda de inhibidores de tripsina (proteasa de tipo serino) y carboxipeptidasa B (de tipo metalo) en varias especies vegetales²⁷. También se utilizó en el tamizaje primario en invertebrados marinos, de inhibidores de papaína, una proteasa de tipo cisteínico de origen vegetal (<http://www.bioveg.bioplantas.cu> pág111). A partir de ese tamizaje se identificó un IP de unión fuerte en la gorgonia *P. homomalla*, que se encuentra actualmente en estudio (Fig. 3B).

Para la identificación exitosa de IP en fuentes naturales, es necesario el procesamiento de un gran número de muestras en corto tiempo, con métodos que ofrezcan una alta confiabilidad y reproducibilidad de los resultados. En tal sentido, se ha desarrollado una estrategia que combina: (i) ensayos enzimáticos de alta productividad (número de muestras/operario/día) para el tamizaje primario y (ii) la re-evaluación de los extractos positivos mediante BIAcore. Con este objetivo, se han utilizado ensayos enzimáticos heterogéneos para la identificación a gran escala, de inhibidores de la proteasa del VIH²⁸ y de Plasmepsina 2 (PlmII)²⁹, proteasa de tipo aspártico de *P. falciparum*, agente causal de la malaria. El re-análisis de los extractos más prometedores mediante BIAcore, permitió la posterior purificación y caracterización de un inhibidor de PlmII en el extracto de *P. homomalla*¹⁹.

Entre las ventajas de la tecnología BIAcore se encuentran: la baja frecuencia de aparición de falsos posi-

vos, su alta sensibilidad y que no requiere el marcaje de sus componentes. Entre sus limitaciones se halla la dificultad para estudiar analitos de muy bajo peso molecular y los sistemas de asociación muy rápida ($k_{as} > 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y/o disociación muy lenta ($k_{dis} < 10^{-5} \text{ s}^{-1}$)⁹.

Por último, se han desarrollado sensores basados en SPR, completamente automatizados y de alta productividad, mediante su acoplamiento con técnicas analíticas de alto flujo como MALDI-TOF MS³⁰. Esta metodología posee un enorme potencial para el estudio de interacciones en proteomas completos, empleando micro-arreglos complejos de proteínas y técnicas de análisis de imágenes²⁴, lo que abre nuevos horizontes a esta potente herramienta en la era post-genómica.

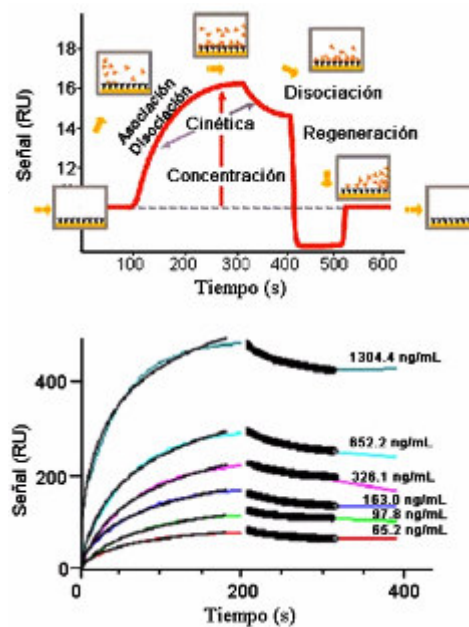


Figura 2. Arriba: Sensograma tipo de un experimento de interacción analito-ligando por el método BIAcore. Se muestra la forma típica de la curva en las distintas etapas del experimento. Abajo: Familia de sensogramas resultantes de la interacción entre la Papaína, inmovilizada en el bioship y concentraciones de proteína crecientes del extracto de la gorgonia *P. homomalla*. Líneas oscuras: sensogramas teóricos del ajuste del modelo de Langmuir a los datos experimentales (estequiometría 1:1).

3 Metodologías complementarias para el estudio de nanopartículas: aplicaciones a la caracterización de complejos proteasa:inhibidor

Dispersión dinámica de la luz. La técnica DLS (del inglés “Dynamic light scattering”), conocida también como espectroscopía de correlación de fotones (PCS), ha demostrado ser eficaz en el estudio de nanopartículas de diferente naturaleza¹³. Los aspectos experimentales y teóricos de esta metodología han sido ampliamente documentados, por lo que no se abordarán en este artículo^{13,31}. Este método, detecta las fluctuaciones de la dis-

persión de la luz láser debidas al movimiento Browniano de las partículas, y que dependen del tamaño de estas moléculas. Las variaciones en el tiempo de este proceso físico, se describen a través de la función de autocorrelación (D), a partir de la cual puede calcularse el radio hidrodinámico (Rh) de las partículas en solución^{13,31}. La metodología DLS fue propuesta inicialmente para estudiar el proceso de nucleación de cristales de proteína en solución, lo que permitió distinguir entre precipitados amorfos y cristalinos en soluciones supersaturadas. En los últimos años DLS se ha aplicado a otros sistemas con el objetivo de conocer el grado de polidispersión (Fig. 3) de las muestras y se considera un método analítico de predicción y monitoreo del proceso de cristalización^{14,31}. También ha cobrado gran interés el estudio del estado de agregación y el cálculo de Rh de proteínas utilizadas en nanopartículas con aplicaciones en la nanomedicina, ya que estos parámetros pueden influir en la efectiva liberación y la actividad de la proteína.

En el caso de los IP, el proceso de autoagregación en solución del inhibidor de tripsina de páncreas bovino (BPTI o aprotinina) ha sido uno de los fenómenos más estudiados³², lo que resulta imprescindible debido a sus aplicaciones biomédicas. Este inhibidor se ha utilizado para mejorar la respuesta terapéutica a la administración por vial oral de biomoléculas peptídicas³³ (Tabla 1).

Otra aplicación de esta metodología ha sido el monitoreo del valor Rh de una nanopartícula proteica debido a su interacción con otras proteínas, lo que permite demostrar la presencia de complejos macromoleculares. También ha permitido investigar características de complejos macromoleculares, por ejemplo la relación estequiométrica y la estabilidad de complejos proteasa-sustrato y proteasa-inhibidor, respectivamente^{14,34}. La comparación del Rh de muestras monodispersas del inhibidor recombinante ShPI-1 en forma libre y en complejo con tripsina bovina, corroboró la formación del complejo ShPI-1-tripsina. Asimismo, se evidenció la estabilidad del complejo debido a la permanencia de la señal de DLS de la nanopartícula en solución por más de 12 días¹⁴.

Cristalografía/Difracción de Rayos-X. Esta metodología permite dilucidar la relación estructura-función de las proteínas mediante la determinación de su estructura 3D. A su vez, este conocimiento ha permitido abordar el diseño racional de nuevos inhibidores y estrategias de mutagénesis sitio específico de IP naturales. Por ejemplo, la mayoría de los inhibidores sintéticos de la proteasa del VIH, utilizados en la actualidad en la terapia antirretroviral, se diseñaron teniendo en cuenta la estructura 3D de esta enzima y de inhibidores de la renina y otras proteasas de tipo aspártico³⁵.

La determinación de la estructura 3D de proteínas involucra el empleo de la radiación de rayos-X, con longitudes de onda similares a las dimensiones de este tipo de biomoléculas (0.1nm-1nm). Sin embargo, debido a que la difracción que produce una molécula individual es muy débil, se requiere obtener un cristal con moléculas

de proteína ordenadas regularmente en forma de una red tridimensional¹².

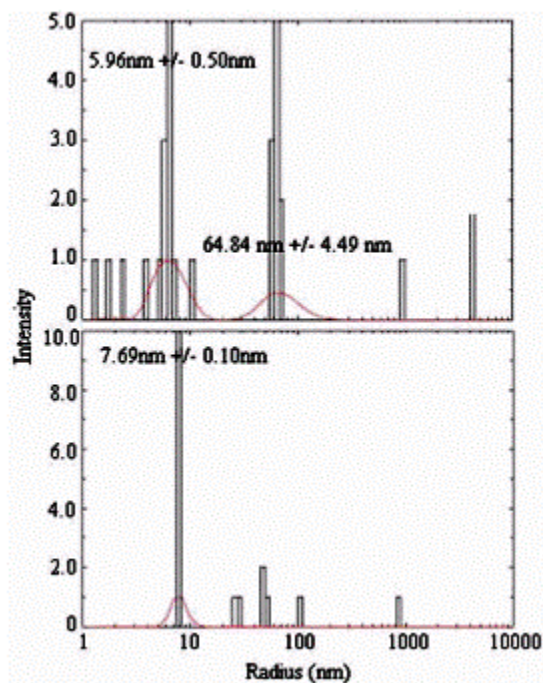


Figura 3. Medición mediante DLS, del grado de polidispersión y el radio hidrodinámico de dos muestras del inhibidor recombinante ShPI-1A. Arriba: Histograma de una muestra polidispersa. Abajo: muestra monodispersa con un solo tipo de partícula en solución y un valor Rh= 7.69 ± 0.10 nm.

Inhibidor	Actividad inhibidora	Aplicación en la nanomedicina
BPTI	Proteasas de tipo serino	Vesículas multilamelares que encapsulan medicamentos peptídicos. Inhibición <i>in vitro</i> de tripsina y ↑ concentración en sangre de drogas (administración oral) ³³ .
rSLPI	Leucoproteasa 1	Encapsulamiento en liposomas. ↑ estabilidad de rSLPI frente a cathepsina L. Terapéutica de enfermedades pulmonares ³⁹ .
IP péptido miméticos	Proteasa VIH	Encapsulación en liposomas y direccionalización a células infectadas ⁴⁰ .
Ritonavir	Proteasa VIH	Reducción de la carga viral por direccionalización en nanopartículas, hacia el sistema nervioso central ⁴¹ .
Cistatina	Proteasas de tipo cisteíno	Encapsulación en nanopartículas, direccionalización a células tumorales de mama. Inactivación de cathepsina B del tumor y reducción de metástasis ⁴² .

↑: Aumento, rSLPI: inhibidor recombinante de la leucoproteasa 1, referencias: 33, 39-42.

La nanocristalización de proteínas, con el empleo de sistemas automatizados, ha permitido disminuir los volúmenes de la muestra a cristalizar, hasta 20-100 nL, en experimentos de difusión al vapor (<http://www.bfsc.leidenuniv.nl/research/nano.html>).

También se ha descrito la posibilidad de crecer cristales en volúmenes de gota de hasta 1 nL³⁶, lo que permite ensayar un mayor número de condiciones de cristalización con igual cantidad de muestra. El empleo de este tipo de sistema permitió determinar la estructura 3D del complejo rShPI-1A-tripsina bovina, utilizando volúmenes de solución de proteína de 20 nL¹⁴.

Por otra parte, el desarrollo y la optimización de los sistemas de colecta de datos de DRX en la actualidad, está permitiendo el uso de cristales de proteínas con dimensiones nanométricas³⁷. La colecta de datos con el empleo de *Sinchronones* de tercera generación, usualmente requiere cristales de, al menos 20 μm, debido al daño que provoca la radiación. Las dimensiones del cristal también dependen del tamaño de la celda unitaria, lo que es particularmente crítico en el caso de proteínas con masas moleculares elevadas. Por ejemplo, para la determinación de la estructura 3D de la proteína de membrana fotosistema I, se utilizaron cristales mayores de 500 μm³⁷. Estas limitaciones, sumado a las dificultades de la producción de cristales, han motivado el interés en la llamada "*powder protein crystallography*"³⁸, utilizada fundamentalmente para proteínas de membrana³⁹. Esta metodología se basa en la determinación de la estructura 3D mediante la colecta de cientos de conjuntos de datos parciales, a partir de muchos cristales con dimensiones nanométricas^{37,38}. Por lo tanto, la cantidad de proteína utilizada actualmente en experimentos de DRX es mucho mayor que la necesaria para producir cristales, lo que demuestra las potencialidades futuras de optimización de los métodos de cristalización de proteínas.

La nanocristalización de proteínas, favorecerá la determinación de la estructura 3D de proteínas minoritarias a partir de genomas completos. Por lo tanto, pudiera complementar los resultados de identificación y caracterización de IP con aplicaciones potenciales en la biomedicina.

4 Consideraciones finales

Uno de los grandes retos de la nanobiotecnología es el desarrollo de "nanoterapias" dirigidas específicamente a los tejidos y órganos enfermos, sin dañar a las células sanas. Entre las biomoléculas utilizadas con este objetivo se encuentran también los IP, lo que abre un camino potencial a la obtención de sistemas de liberación y protección de este tipo de biomoléculas (Tabla 1). De esta manera, las herramientas y técnicas en la micro- y la nanoescala han sido empleadas no sólo para la identificación y estudio molecular de los IP, sino también en su manipulación para el desarrollo de nanopartículas con aplicaciones en la nanomedicina. Esto pudiera producir grandes avances diagnósticos y terapéuticos, lo que a su

vez, demuestra la importancia de estas tecnologías para la identificación y caracterización de nuevos IP.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Dr. Tirso Pons, del Laboratorio de Biología Computacional y diseño de proteínas del CEP, por su ayuda durante la preparación y revisión del manuscrito.

Referencias

1. P. D. Gupta, D. Manasi, A. R. Vasavada, "Protein nanotechnology—a powerful futuristic diagnostic technique", *Indian J. Clin. Biochem.*, 20(2), 48-53 (2005).
2. M. R. Choi, K. J. Stanton-Maxey, J. K. Stanley, "A cellular Trojan horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors", *Nano Lett.*, 7, 3759-65 (2007).
3. G. MacBeath, S. L. Schreiber, "Printing proteomics as microarrays for high throughput function determination". *Science*, 289, 1760-1763 (2000).
4. L. Hedstrom, "Serine proteases Mechanism and specificity", *Chem. Rev.*, 102, 4501-4523 (2002).
5. H. Neuhof, C. Hoffmann, W. Seeger, N. Suttrop, H. Fritz, "Proteases as mediators of pulmonary vascular permeability", *Prog. Clin. Biol. Res.*, 308, 305-314 (1989).
6. G. Abbenante, D. P. Fairlie, "Protease inhibitors in the Clinic". *Med. Chem.*, 1, 71-104 (2005).
7. P. Torrerri, M. Ceccarini, P. Macioce, T. C. Petrucci, "Biomolecular interactions by Surface Plasmon Resonance technology". *Ann Ist Super Sanità*, 1, 437-441 (2005).
8. J. Villanueva, O. Yanes, E. Querol, L. Serrano, F. X. Avilés, "Identification of Protein Ligands in Complex Biological Samples Using Intensity-Fading MALDI-TOF Mass Spectrometry", *Anal. Chem.*, 75, 3385-3395 (2003).
9. O. Yanes, J. Villanueva, E. Querol, F. X. Avilés, "Detection of non-covalent protein interactions by 'Intensity fading' MALDI-TOF MS: applications to proteases and protease inhibitors". *Nature Protoc.* 2, 119-130 (2007).
10. J. Drenth, "Principles of Protein X-Ray Crystallography", en *Springer Advanced Texts in Chemistry 3rd ed.*, XVI, 332 p. 159, ISBN: 978-0-387-33334-22007 (2007).
11. F. R. Hallet, "Particle size analysis by dynamic light scattering". *Food Res. Intern.*, 27, 195-198 (1994).
12. R. García, L. Redecke, T. Pons, M. Perbandt, D. Gil, M. Manzur, Y. González, M. A. Chávez, C. Betzel, "Crystal structures of the recombinant Kunitz type inhibitor-1 from the sea anemone *S. helianthus* and its complex with bovine trypsin: dynamic light scattering and intensity fading studies". *J. Mol. Biol.* (en preparación).
13. J. M. Guisán, "Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells", 2nd Edition, Humana Press Inc., Totowa, NJ, p.15-30 (2008).
14. G. T. Hermanson, A. K. Mallia, P.K. Smith, "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press (Ed), New York, 454 p. (1992).
15. A. R. Ramírez, Y. Guerra, A. Otero, B. García, C. Berry, J. Mendiola, A. Hernández-Zarnui, M. A. Chávez, "Generation of an affinity matrix useful in the purification of inhibitors of Plasmeprin II, an antimalarial drug target", *Biotech. Appl. Biochem.*, 52(2), 149-152 (2009).
16. A. del Monte, Y. Fernández-Marrero, H. Gómez, M. Chappé, A. Alexander, J. González, R. Romero, E. Salas, I. Pascual, M. A. Chávez, G. Sandoval, H. Nolasco, J. Díaz, "Rational Design of Immobilized Derivatives for Affinity

Chromatography and Enzymatic Bioconversion”, III International Conference on Enzyme Technology, P.2 (2007).

19. Y. Guerra, “Expresión en *E. coli* de PlmII y PlmIV y purificación y caracterización de un inhibidor a partir del extracto de *P. homomalla*”, Tesis de Maestría. Facultad de Biología. Universidad de La Habana (2009).

20. Y. González, T. Pons, J. Gil, V. Besada, M. Alonso del Rivero, M. S. Araujo, M. A. Chávez, “Characterization and comparative 3D modeling of CmPI-II, a novel ‘non-classical’ Kazal-type inhibitor from the marine snail *Cenchritis muricata* (Mollusca) Biol. Chem., 388, 1183–1194 (2007).

21. M. Alonso del Rivero, “Purificación y caracterización de un nuevo inhibidor bifuncional de metalocarboxipeptidasa A y proteasas de tipo serino, a partir del anélido *S. magnifica*”, Tesis de Doctorado. Facultad de Biología. Universidad de La Habana (2007).

22. J. Delfin, V. Morera, Y. González, J. Díaz, M. Márquez, N. Larionova, A. Saroyán, G. Padrón, M. A. Chávez, “Purification and characterization of proteinase inhibitors from the sea anemone *S. helianthus*”, *Toxicon* 34(11/12), 1367-1376 (1996).

23. M. Mansur, “Sistema de obtención de insulina humana a partir de *Pichia pastoris*”, Tesis de Doctorado. Facultad de Biología. Universidad de La Habana (2007).

24. J. S. Yuk, K. Ha, “Proteomic applications of surface plasmon resonance biosensors: analysis of protein arrays”. *Exp. Mol. Medicine*, 37, 1-10 (2005).

25. P. Markgren, M.T. Lindgren, K. Gertow, R. Karlsson, U. H. Danielson, “Determination of Interaction Kinetic Constants for HIV-1 Protease Inhibitors Using Optical Biosensor Technology”, *Anal. Biochem.*, 291, 207-218 (2001).

26. D. Backman, M. Monod, U. H. Danielson, “Biosensor-Based Screening and Characterization of HIV-1 Inhibitor Interactions with Sap 1, Sap 2, and Sap 3 from *Candida albicans*”, *J. Biomol. Screening*, 11(2), 165-175 (2006).

27. J. Borch, P. Roespstorff, “Screening for Enzyme Inhibitors by Surface Plasmon Resonance Combined with Mass Spectrometry”, *Anal. Chem.*, 76, 5243-5248 (2004).

28. O. A. Gutiérrez, E. Salas, Y. Hernandez, E. A. Lissi, G. Castrillo, O. Reyes, H. Garay, A. Aguilar, B. Garcia, A. Otero, M. A. Chavez, C. Duarte, “An immunoenzymatic solid-phase assay for quantitative determination of HIV-1 protease activity”, *Anal. Biochem.*, 307, 18-24 (2002).

29. E. Salas, A. Ramírez, A. Otero, R. Vázquez, O. Reyes, J. Mendiola, C. A. Duarte, A. Otero, O. A. Gutiérrez, M. A. Chávez, “A heterogeneous enzymatic assay for quantification of Plasmepsin II activity and the evaluation of its inhibitors”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34, 833-40 (2004).

30. D. Nedelkov, R.W. Nelson, “Surface plasmon resonance mass spectrometry: recent progress and outlooks”. *TRENDS in Biotechnology*, 21(7), 301-305 (2003).

31. W. Wilson, “Monitoring Crystallization Experiments Using Dynamic Light Scattering: Assaying and Monitoring Protein Crystallization in Solution”, *Methods: A Companion to Methods Enzymol.*, 1(1), 110-117 (1990).

32. M. Gottschalk, K. Venu, B. Halle, “Protein Self-Association in Solution: The Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor Decamer”, *Biophys. J.*, 84, 3941–3958 (2003).

33. M. Werle, H. Takeuchi, “Chitosan-aprotinin coated liposomes for oral peptide delivery: Development, characterization and *in vivo* eval”, *Int. J. Pharm.*, 370, 26-32 (2009).

34. K. C. Pandey, S. X. Wang, P. S. Sijwali, A. L. Lau, J. H. McKerrow, P. J. Rosenthal, “The *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2 captures its substrate, hemoglobin, via a unique motif”, *PNAS* 102 (26), 9138–9143 (2005).

35. T. L. Blundell, R. Lapatto, A. F. Wilderspin, A. M. Hemmings, P. M. Hobart, D. E. Danley, P. J. Whittle, “The 3-D structure of HIV-1 proteinase and the design of antiviral agents for the treatment of AIDS”, *Trends Biochem Sci.*, 15(11), 425-430 (1990).

36. M. E. Uil, E. Maxim, E. R. Bodestaff, F. J. Hoedemaeker, J. Abrahams, “Protein nano-crystallogenesis”, *Enz. Microbial Technol.*, 30(3), 262-265 (2002).

37. D. Shapiro, H. Chapman, D. DePonte, R. Doak, P. Fromme, G. Hembree, M. Hunter, S. Marcheni, K. Schmidt, J. Spence, D. Starodub, U. Weierstall, “X-ray Powder diffraction from a continuous microjet of submicrometer protein crystals”, *J. Synchrotron Radiat.* 15(6), 593-9 (2008).

38. I. Margiolaki, J. P. Wright, “Powder crystallography on macromolecules”, *Acta Crystallogr. A.* 64(1), 169-180 (2008).

39. A. M. Gibbons, N. G. McElvaney, C. C. Taggart, S. A. Cryan, “Delivery of rSLPI in a liposomal carrier for inhalation provides protection against cathepsin L degradation”, *J. Microencapsul.*, 9, 1-10 (2008).

40. N. Düzgüneş, E. Pretzer, S. Simões, V. Slepshkin, K. Konopka, D. Flasher, M. C. de Lima, “Liposome-mediated delivery of antiviral agents to human immunodeficiency virus-infected cells”, *Mol. Membr. Biol.* 16(1), 111-8 (1999).

41. K. S. Rao, M. K. Reddy, J. L. Horning, V. Labhasetwar, “TAT-conjugated nanoparticles for the CNS delivery of anti-HIV drugs”, *Biomaterials*, 33, 4429-38 (2008).

42. N. Obermajer, P. Kocbek, U. Repnik, A. Kuznik, M. Cegnar, J. Krist, J. Kos, “Immunonanoparticles: an effective tool to impair harmful proteolysis in invasive breast tumor cells”, *FEBS J.*, 274(17), 4416-27 (2007).