

**Universidad:** Universidad Nacional de La Plata

**Facultad/Centro/Instituto:** Facultad de Ciencias Exactas/Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales.

**Título del Trabajo:** "IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES PEPTÍDICOS DE PROTEASAS CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOMÉDICA OBTENIDOS A PARTIR DE *SOLANUM TUBEROSUM* SUBESPECIE *ANDÍGENA* VARIEDAD IMILLANEGRA (PAPA ANDINA)".

**Autor/es:** José Sebastián Cisneros, Mariana Edith Tellechea, María Florencia Ceccacci.

**Nivel de formación del investigador principal:** Estudiante (no graduado).

**Orientador (si lo hubiere):** Walter David Obregón.

**Núcleo Disciplinario/Comité Académico/Otros Temas:** Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones.

**Correo electrónico del autor principal:** josesebastiancisneros@hotmail.com

**Palabras Clave:** Serinproteasas/serinoproteasas, biofármacos/biodrogas, inhibidores/inibidores.

## **RESUMEN:**

### Introducción:

Los inhibidores de proteasas (IPs) tienen importantes aplicaciones en la biomedicina, la biotecnología y el diagnóstico. Una regulación precisa de la actividad proteolítica es esencial para la fisiología humana, por esto muchas proteasas se han convertido en importantes dianas biomédicas, protagonizando casi la mitad de los fármacos del mundo para el tratamiento de patologías. Estudios con células cancerosas indicaron que algunos inhibidores actúan sobre diferentes proteasas serínicas que están implicadas en las cadenas de señalización de células tumorales, impidiendo su proliferación.

### Objetivos:

El objetivo de este trabajo es el aislamiento, purificación e identificación de nuevos inhibidores de proteasas obtenidos a partir de tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* variedad Imillanegra, provenientes de la región andina, para su potencial aplicación en el desarrollo de nuevos biofármacos.

### Materiales y Métodos:

La combinación de la espectrometría de masas junto a la inmovilización de proteasas ha logrado desarrollar una técnica rápida y versátil "High-throughput screening" (HTS) que permite realizar un screening rápido para la identificación molecular. Esta metodología ha permitido identificar IPs en extractos heterogéneos que fueron posteriormente purificados y caracterizados por métodos convencionales.

### Resultados:

Se encontraron nuevos inhibidores de tripsina y subtilisina (serinproteasas) que fueron caracterizados bioquímicamente.

### Conclusiones:

Los procesos de purificación mediante inmovilización enzimática han sido claves para el aislamiento de inhibidores. Estas biomoléculas abren un camino potencial para el desarrollo de tratamientos adecuados para diversas enfermedades. Esto pudiera producir grandes avances diagnósticos y terapéuticos, lo que demuestra la importancia de estas tecnologías para la identificación y caracterización de nuevos IPs.

## **Introducción:**

### **Fundamentos de la búsqueda de inhibidores de proteasas:**

Los productos naturales constituyen una de las mayores fuentes para el desarrollo de medicamentos, debido a su diversidad química y a que se les supone una toxicidad inicial limitada al encontrarse en seres vivos. Entre estos productos se encuentran los inhibidores de proteasas (IPs). Las fuentes vegetales de IPs han sido escasamente exploradas y tienen la ventaja de su extraordinaria riqueza y diversidad. Tienen menor costo de obtención y procedimientos muy sencillos, si se comparan con los procedimientos de obtención por síntesis química. Estas fuentes naturales prometen grandes esperanzas en la obtención de moléculas bioactivas novedosas y efectivas.

Los inhibidores de proteasas (IPs) representan para los organismos una eficiente vía de control de la actividad de proteasas endógenas, que necesitan ser balanceadas en estado normal para obtener una proteólisis controlada. Seguramente el mayor incentivo para la búsqueda de nuevos IPs es que el control de la proteólisis representa una herramienta terapéutica valiosa, habiendo probado su utilidad no sólo en modelos experimentales sino también como agentes terapéuticos en humanos <sup>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7</sup>. La actividad de los IPs obedece a su capacidad de formar complejos estables con las proteasas blanco, bloqueando, alterando o impidiendo el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima.

Los inhibidores peptídicos de proteasas (IPPs) tienen importantes aplicaciones en la biomedicina, la biotecnología y el diagnóstico. La apoptosis, la coagulación de la sangre y las cascadas de señalización celular son algunos de los procesos en los que participan las proteasas escindiendo proteínas o proenzimas. Una regulación precisa de la actividad proteolítica es esencial para la fisiología humana, es por esto que muchas proteasas se han convertido en importantes dianas biomédicas, siendo protagonistas en casi la mitad de los fármacos del mundo. La actividad de los IPPs ha motivado su uso en la biotecnología así como en el diagnóstico o terapéutica de enfermedades tan diversas como el cáncer y el Alzheimer, enfermedades inmunológicas, inflamatorias, cardiovasculares y respiratorias, como el asma, e infecciones parasitarias, fúngicas y virales, como la malaria, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), las hepatitis, entre otras.

Con todo esto; y aprovechando también nuestra experiencia en el estudio bioquímico y estructural de las proteínas, sus aplicaciones biotecnológicas y la infraestructura disponible en nuestro laboratorio; se propuso a partir de muestras de papas andinas (*Solanum tuberosum subespecie andígena* de la variedad Imillanegra) que crecen en nuestro país; detectar, purificar, caracterizar bioquímicamente y aplicar técnicas bioinformáticas sobre nuevos inhibidores de proteasas que demuestren posibilidades de

potenciales aplicaciones a nivel farmacológico y biomédico. Pueblos originarios que cultivan estas papas andinas, usan la Imillanegra para tratar enfermedades respiratorias.

#### Fundamentos de la metodología a utilizar:

Se utilizaron diversas técnicas de purificación y caracterización, entre las cuales destacamos una cromatografía de afinidad particularmente diseñada con proteasas inmovilizadas covalentemente a un soporte especial\*<sup>1</sup> y una técnica proteómica denominada Intensity Fading MALDI-TOF/MS\*<sup>2</sup>, que permite detectar e identificar pequeñas cantidades de moléculas presentes en una muestra biológica.

*\*1 “Inmovilización covalente de proteasas: sobre matrices de agarosa especialmente diseñadas, para ello se usan geles de agarosa, los cuales se activan con glicidol, para generar glioxil-agarosa, que permite la unión de las proteínas en forma estable y covalente, generando un gran poder de reutilización de los rellenos de afinidad”.*

*\*2 “Intensity fading MALDI/TOF: 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. El método fue desarrollado para identificar IPP a partir de mezclas naturales complejas mediante su capacidad de interacción con las proteasas que inhibe. La formación del complejo se detecta mediante la atenuación total o parcial 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 inicial.”*

La variante diseñada por nosotros incluye primariamente una etapa de afinidad con la proteasa inmovilizada en micropartículas poliméricas. El inhibidor retenido en la micropartícula puede ser eluido selectivamente y analizado mediante espectrometría de masas. De esta forma, la reaparición o el aumento de la intensidad de la señal en el espectro de la fracción eluida, corroboró la presencia de una molécula capaz de interactuar con la proteasa inmovilizada y descarta la posibilidad de interacciones inespecíficas. Esta metodología ha permitido identificar IPPs en extractos heterogéneos que fueron posteriormente purificados y caracterizados por métodos convencionales.

#### Objetivos:

- a) Obtener extractos crudos a partir de tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* variedad Imillanegra (papa andina).
- b) Detectar actividad inhibitoria de tripsina y subtilisina en los extractos obtenidos.
- c) Caracterizar bioquímicamente los extractos crudos obtenidos mediante técnicas convencionales (PM, pl, tratamiento térmico)

- d) Purificar cromatográficamente los inhibidores de proteasas (IPs) obtenidos empleando matrices de afinidad especialmente diseñadas mediante el uso de proteasas diana inmovilizadas en soportes de glioxil-agarosa.
- e) Identificar los IPs mediante técnicas proteómicas tales como Peptide Mass Fingerprint (PMF) e Intensity fading MALDI-TOF.
- f) Caracterizar bioquímicamente a los inhibidores purificados.

### **Materiales y métodos:**

#### Preparación de los extractivos crudos:

Se utilizó como material de partida tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* variedad Imillanegra. Los mismos se pelaron y trituraron en presencia de agentes antioxidantes. Se mezclaron con ditioneitol (DTT) a una concentración de 0,2 mM para prevenir la oxidación de polifenoles y luego con agua bien fría, se sedimentó el almidón mediante incubación por 30 min. en la heladera y el sobrenadante se centrifugó a 5000 rpm por 60 min. a 4 °C en tubos de muestra de 50ml. Luego se trasvasaron los sobrenadantes a tubos eppendorfs y se centrifugaron nuevamente a 11000 rpm por 60 min. a 4 °C. Posteriormente los sobrenadantes fueron filtrados, obteniéndose de este modo el extracto crudo (EC). La concentración de los inhibidores se determinó mediante el método de Bradford.

#### Determinación de actividad inhibitoria de proteasas:

A los EC se les realizaron determinaciones de actividad inhibitoria de proteasas empleando las siguientes proteasas blanco:

- *Determinación de actividad inhibitoria de tripsina:*

La actividad fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410nm mediante medidas continuas durante 300 seg a 37°C. Se siguieron dos procesos para poner en evidencia la inhibición, sin preincubación y con una preincubación de 15 minutos de la muestra y enzima. Buffer de reacción: Tris-HCl 0,1M; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 50mM; pH 8. Solución de enzima: Tipo I de páncreas bovino (Sigma-Aldrich). Concentración de enzima: 2,8x10<sup>-7</sup>M. Solución de sustrato: BAPNA (N-alfa-Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida) 10mM. Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

- *Determinación de actividad inhibitoria de subtilisina:*

La actividad fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410nm mediante medidas continuas durante 300 seg a 37°C. Se siguieron dos procesos para poner en evidencia la inhibición, sin preincubación y con una preincubación de 15 minutos de la muestra y enzima. Buffer de reacción: Tris-HCl 50mM de pH 8,6 con 10% de DMSO.

Solución de enzima: Subtilisina de *Bacillus Licheniformis* (Sigma-Aldrich). Concentración de enzima:  $2,0 \times 10^{-7} M$ . Solución de sustrato: Benzylocarbonyl-glycyl-glycyl-L-leucine-4-nitroanilide (GLPNA) Bachem. Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

#### Tratamiento térmico del extracto crudo:

La mayoría de los inhibidores de proteasas que han sido identificados presentan una estructura compacta estabilizada por numerosos puentes disulfuro, esta característica estructural provee a la molécula de cierta estabilidad frente a determinadas condiciones extremas. Las muestras fueron tratadas térmicamente por calentamiento a 60 °C, 70 °C, 80 °C y 90 °C durante 60 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 11000 rpm por 90 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue analizado para verificar la presencia de inhibidores estables térmicamente.

#### Purificación cromatográfica del extracto crudo:

El EC fue sometido a cromatografía de afinidad empleando tripsina inmovilizada previamente en el soporte glioxil agarosa. Los inhibidores fueron separados por cambio de pH del solvente de elución.

Cromatografía de afinidad: El diseño de matrices de afinidad mediante la inmovilización de enzimas, 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 IPP y otras proteínas con potencialidades terapéuticas, las que requieren de un alto grado de homogeneidad.

#### Caracterización bioquímica de los extractos crudos y de los inhibidores obtenidos:

El EC y los IPPs aislados se analizaron por SDS-PAGE y espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar sus pesos moleculares. También se les determinó el punto isoeléctrico mediante la técnica de isoelectroenfoque.

#### Identificación mediante Intensity Fading MALDI-TOF/MS:

Los experimentos de Intensity Fading MALDI-TOF MS serán llevados a cabo utilizando un espectrómetro de masas Ultraflex MALDI-TOF (Bruker, Bremen, Germany) equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm. Para el análisis la muestra biológica (1  $\mu$ l) será mezclada con una solución de ácido sinapínico en TFA 0,1% (2  $\mu$ l) como matriz y luego será depositada sobre una placa de siembra (polished steel) y se dejará secar a T° ambiente<sup>8,9</sup>.

### Análisis de la huella peptídica:

Se realizó la digestión trípica de las bandas de SDS-PAGE para el análisis de la huella peptídica o “peptide mass fingerprint” (PMF) que se empleó para la identificación de los inhibidores aislados. Para ello las bandas fueron cortadas, lavadas y decoloradas. Posteriormente se redujeron y alquilaron los grupos Cys libres y se incubaron en presencia de tripsina a 37°C durante 2 horas para la digestión de los inhibidores. Los péptidos generados fueron analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF/MS.

## **RESULTADOS:**

### Elección del medio de extracción:

El proceso de obtención del extracto crudo (EC) utilizado para la determinación de la caracterización del mismo fue finalmente el que se obtuvo a partir de agua destilada, en frío, con DTT y filtrado con membrana.

*Al probar con varias opciones se eligió ésta debido a que al realizar las determinaciones experimentales no había sales y tampoco compuestos que oxidaban las muestras cada vez q se descongelaba el extracto crudo. De esta manera no se veían interferidas las distintas determinaciones experimentales como por ejemplo; medidas espectrofotométricas, SDS-PAGE, IEF, etc.*

Los demás extractivos fueron descartados por diferentes motivos, entre los cuales destacamos pardeamiento y alto contenido salino que interfiere en los ensayos de determinación de actividad, entre otras cosas.

La concentración de proteínas del EC final elegido para los posteriores ensayos de caracterización fue de 577,46 µg/ml.

### Evidencia de la presencia de inhibidores de proteasas:

Ensayos de inhibición proteolítica:

El paso siguiente consistió en determinar la presencia de inhibidores de proteasas en el EC. Para ello se realizó un screening de cinética de inhibición enzimática y se pudo detectar las siguientes actividades inhibitorias: serinproteasas (tripsina y subtilisina).

Las curvas de inhibición con respecto a tripsina con y sin EC se muestran en la figura 1. Y las curvas de inhibición con respecto a subtilisina con y sin EC se muestran en la figura 2.

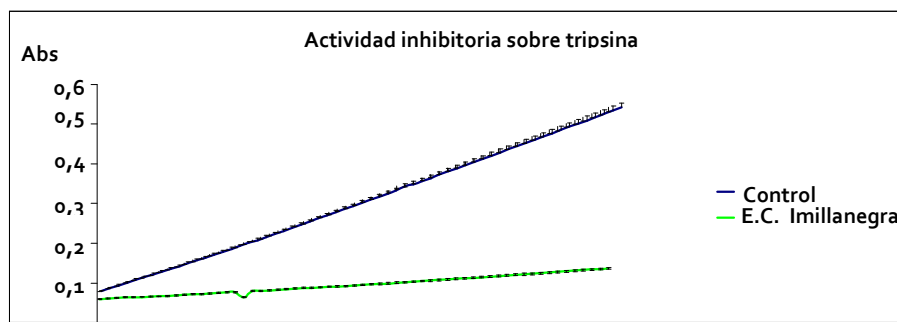


Figura 1: En azul se muestra la curva control que corresponde a la actividad de la tripsina con el sustrato sin inhibidor (E.C. Imillanegra). En verde se muestra la curva control que corresponde a la actividad de la tripsina con el sustrato con inhibidor.

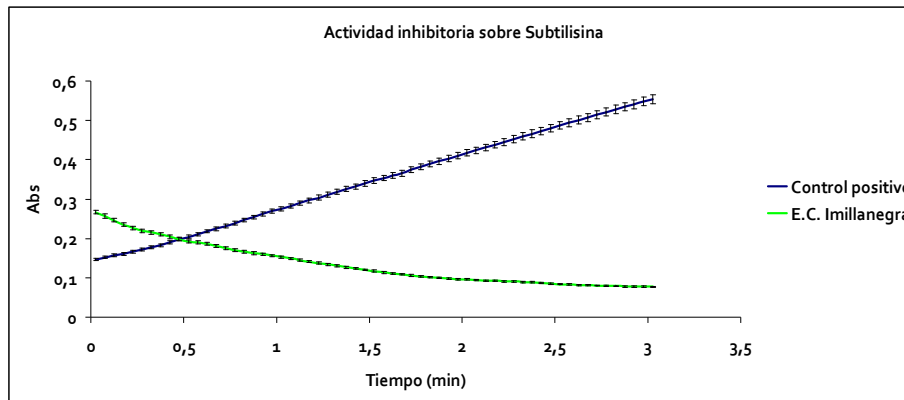
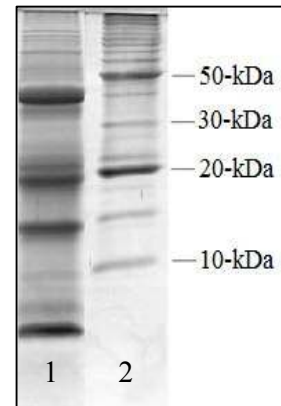


Figura 2: En azul se muestra la curva control que corresponde a la actividad de la subtilisina con el sustrato sin inhibidor (E.C. Imillanegra). En verde se muestra la curva de que corresponde a la actividad de la subtilisina con el sustrato y el inhibidor.

Perfil proteico mediante SDS PAGE:

El perfil electroforético del EC muestra la composición proteica por tamaños moleculares que abarcan desde los 3000 Da hasta los 100000 Da. (Figura 3).

Figura 3: SDS-PAGE del extracto crudo de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad imillanegra. Calle 1: Extracto crudo. Calle 2: Patrones moleculares.



Purificación de los inhibidores:

Tratamiento térmico:

Con el fin de obtener algunos de los inhibidores presentes en el EC de Imillanegra, se procedió a un tratamiento térmico del EC como segunda etapa de purificación, ya que la formación de un EC clarificado y libre de pigmentos la consideramos como una primera y muy importante etapa de aislamiento. Se sabe que los inhibidores de proteasas generalmente presentan cierta estabilidad frente a tratamientos térmicos extremos, debido a ello, se los sometió a incubación a distintas temperaturas y se evaluó la actividad inhibitoria

residual de cada proceso. El EC obtenido en agua fría con DTT y filtración con membrana se incubó a 60 °C, 70 °C, 80 °C, y 90 °C durante 60 minutos. Luego se centrifugó durante 90 minutos a 11000 rpm, descartando el pellet y quedándonos con el sobrenadante. Con este tratamiento el homogenato se clarificó satisfactoriamente especialmente con el tratamiento a 70 °C que permitió recuperar la actividad inhibitoria eliminando una fracción importante de las proteínas presentes en la preparación, demostrando de esta manera que el inhibidor es resistente a la inactivación térmica.

Concentración de proteínas determinadas por el método de Bradford:

Muestra	Concetración
Extracto Crudo	577,46 µg/ml
Extracto Crudo a 60 °C	419,89 µg/ml
Extracto Crudo a 70 °C	105,68 µg/ml
Extracto Crudo a 80 °C	102,78 µg/ml
Extracto Crudo a 90 °C	100,68 µg/ml

Figura 4: SDS-PAGE.

Calle 1: Marcadores peptídicos. Calle 2: E.C..  
 Calle 3: Tratamiento térmico del E.C. a 60 °C.  
 Calle 4: Tratamiento térmico del E.C. a 70 °C.  
 Calle 5: Tratamiento térmico del E.C. a 80 °C.  
 Calle 6: Tratamiento térmico del E.C. a 90 °C.

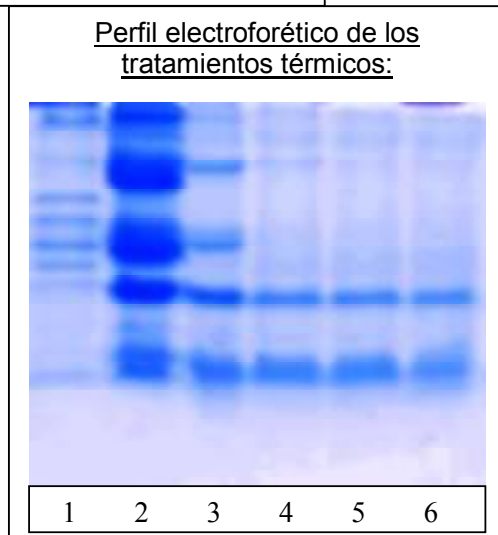
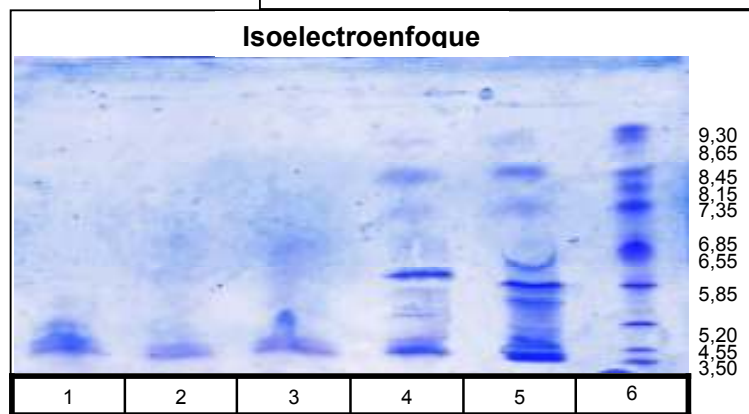


Figura 5: Se muestra la purificación parcial del inhibidor de Tripsina.

Calle 1: Tratamiento térmico del extracto crudo a 90 °C.  
 Calle 2: Tratamiento térmico del extracto crudo a 80 °C.  
 Calle 3: Tratamiento térmico de l extracto crudo a 70 °C.  
 Calle 4: Tratamiento térmico del extracto crudo a 60 °C.  
 Calle 5: Extracto crudo. Calle 6: Marcadores de pl.



Cromatografía de afinidad:

Para realizar la cromatografía de afinidad se decidió usar tripsina inmovilizada como soporte. Debido a esto, de aquí en adelante los resultados se hacen en base a la actividad

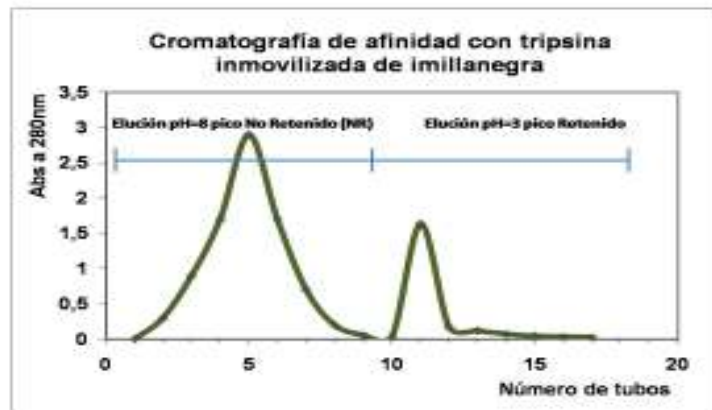


inhibitoria de tripsina. Esto se debió a que la obtención de subtilisina inmovilizada no fue posible debido a su elevado costo. Inicialmente se hizo una prueba de actividad a la matriz de tripsina inmovilizada en agarosa la cual se iba a convertir en el relleno de la columna de afinidad. Se utilizó el protocolo de actividad para tripsina utilizando BAPNA como sustrato.

Con el objeto de aislar el inhibidor de tripsina, se empleó el EC sometido a un tratamiento térmico de 70 °C durante 60 minutos, debido a que la actividad inhibitoria se conserva a dicha temperatura y el rendimiento es muy bueno. Luego se puso realizó la cromatografía de afinidad obteniéndose una fracción retenida, la cual mantuvo actividad inhibitoria de tripsina.

Figura 6:

El cromatograma nos muestra una fracción no retenida que sale con el lavado y una fracción retenida es eluída con una solución de HCl a pH = 3 y que presentó un máximo de absorbancia de 1,722.



En la figura 7 se compara la inhibición de la tripsina desde el E.C. de Imillanegra hasta los distintos tratamientos térmicos del mismo junto a la fracción retenida del E.C. tratado térmicamente a 70 °C de la cromatografía de afinidad con tripsina inmovilizada.

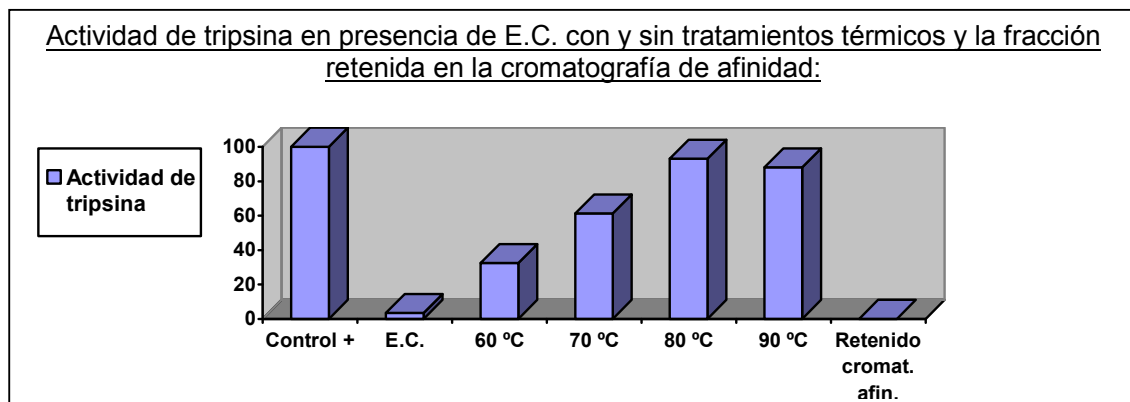


Figura 7: El Control + se refiere a la actividad de la tripsina con el sustrato solamente. Este gráfico nos muestra que la fracción retenida de la salida de afinidad mantiene un gran porcentaje de inhibición sobre tripsina.

Determinación de la masa molecular mediante espectrometría de masas MALDI-TOF:

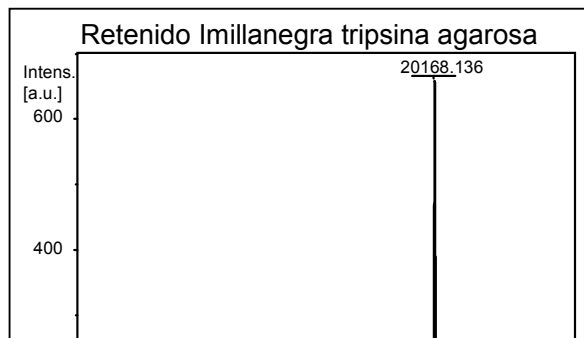
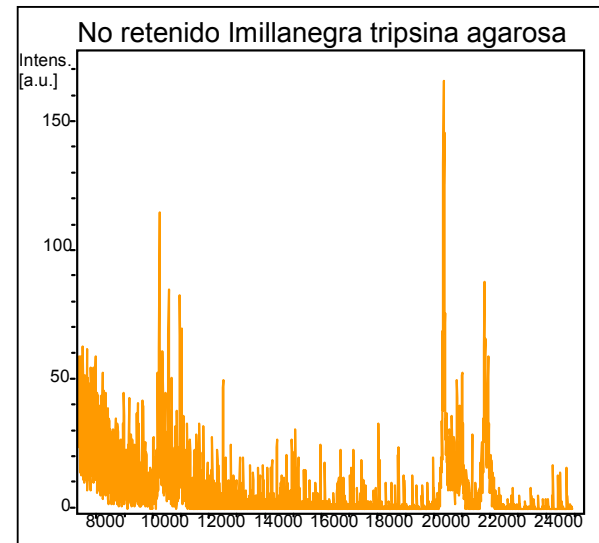
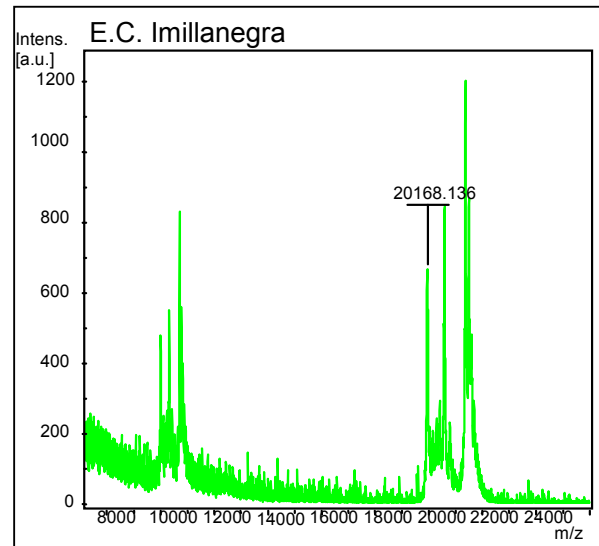
La determinación de la masa molecular del inhibidor de tripsina arrojó un pico principal con una masa molecular de 20168 Da. Esto se puede deber a la presencia de

isoinhibidores con pesos moleculares muy parecidos que generalmente no se detectan por electroforesis. Por otro lado, el pico de 10084 Da es exactamente la mitad de 20168 Da, que es la masa del pico mayoritario, que corresponde a la proteína ionizada doblemente cargada.

Confirmación de la identificación del inhibidor mediante técnicas proteómicas:

A) Intensity Fading MALDI-TOF:

Se confirmó la presencia de inhibidores mediante la técnica proteómica de alta eficiencia denominada Intensity Fading MALDI-TOF/ MS. Los IPPs aislados se analizaron en el Servicio de Proteómica del Instituto de Biomedicina y Biotecnología (IBB) de la Universidad Autónoma de Barcelona(UAB) la UAB como parte de un intercambio previsto en el Proyecto de Cooperación Bilateral: Genómica y Proteómica de Biomoléculas de Origen Vegetal otorgado por el MinCyT de Argentina y el MICINN de España.



### B) Huella peptídica:

Se han identificado en estos extractos, a partir de una huella peptídica de una digestión trípica de cada una de las bandas (Fig 4), los distintos componentes mayoritarios presentes en dicho extracto (Fig 8).

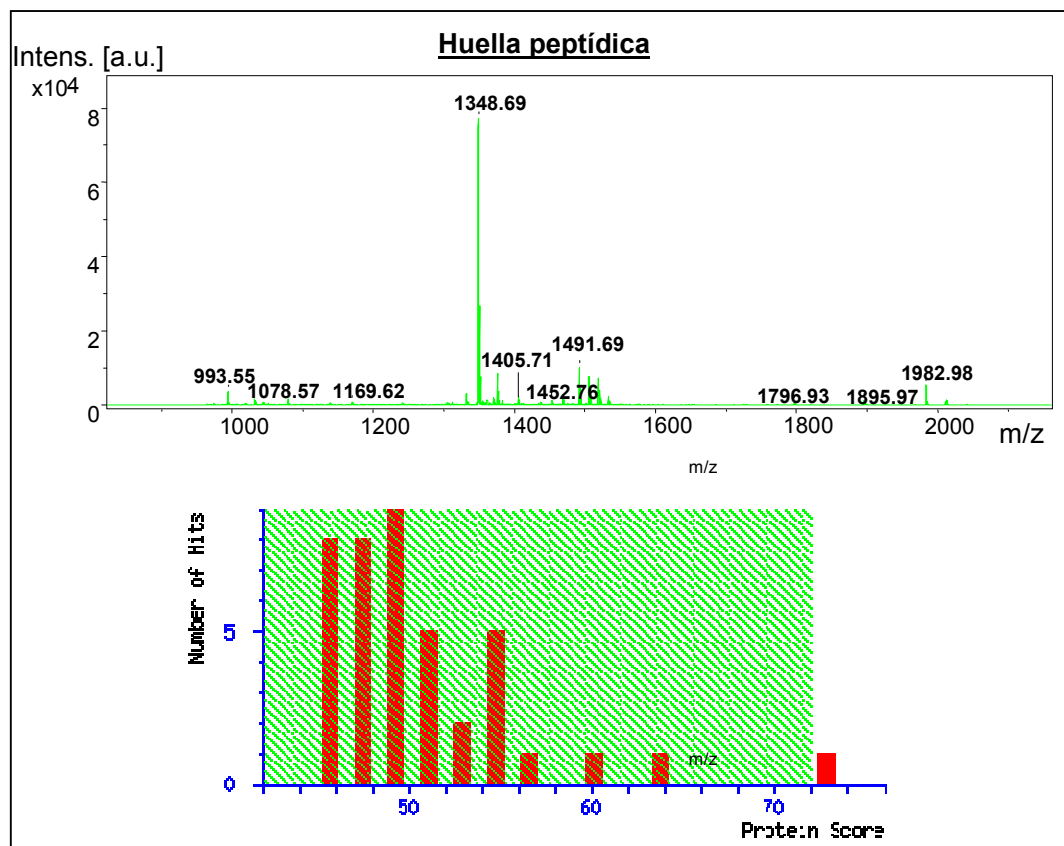


Figura 8: Database: NCBI nr 20110312 (13366630 sequences; 4577707277 residues). Taxonomy: *Viridiplantae* (Green Plants) (855878 sequences). Timestamp: 15 Mar 2011 at 04:28:29 GMT. Top Score: 73 for gi|238684515, Kunitz-type proteinase inhibitor group A1 [*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*].

### Discusión:

Los procesos de purificación mediante inmovilización enzimática han sido claves para el aislamiento de inhibidores. Estas biomoléculas abren un camino potencial para el desarrollo de tratamientos adecuados para diversas enfermedades. De esta manera, las herramientas y técnicas en la micro y la nanoescala han sido empleadas no sólo para la identificación sino también en el estudio molecular de los IPs. 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 IPs<sup>10, 11, 12</sup>.

### **Referencias:**

1. Ottaviani, J. I., Actis-Goretta, L., Villordo, J. J., & Fraga, C. G. (2005). Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Biochimie* 88, 359–365.
2. Wood, J. M., Maibaum, J., Rahuel, J., Grutter, M. G., Cohen, N. C., Rasetti, V. (2003). Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 698–705.
3. Arribas, J. R., Pulido, F., Delgado, R., Lorenzo, A., Miralles, P., Arranz, A. (2005). Lopinavir/ritonavir as single-drug therapy for maintenance of HIV-1 viral suppression: 48-week results of a randomized, controlled, open-label, proof-of-concept pilot clinical trial (OK Study). *J Acquir Immune Defic Syndr* 40, 280–287.
4. Turk, V., J. Kos And B. Turk (2004) "Cysteine cathepsins (proteases)—On the main stage of cancer?", *Cancer Cell*, 5: 409-410 (review). *Cancer Cell* 5: 409-20
5. Lamarre, D., Anderson, P. C., Bailey, M., Beaulieu, P., Bolger, G., Bonneau, P. (2003). An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 426, 186–189.
6. Binford, S. L., Maldonado, F., Brothers, M. A., Weady, P. T., Zalman, L. S., Meador, J. W. (2005). Conservation of amino acids in human rhinovirus 3C protease correlates with broad-spectrum antiviral activity of rupintrivir, a novel human rhinovirus 3C protease inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 619–626.
7. Malcolm, B. A., Liu, R., Lahser, F., Agrawal, S., Belanger, B., Butkiewicz, N. (2006). SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1013–1020.
8. Alonso-del-Rivero, M., S. A. Trejo, et al. (2009). "A novel metalloprotease-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*--a step into the invertebrate world of proteases." *FEBS J* 276(17): 4875-90.
9. Hillenkamp, F. and M. Karas (1990). "Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization." *Methods Enzymol* 193: 280-95.
10. M. Shabab Æ Mahesh J. Kulkarni Æ M. Islam Khan, "Study of Papain–Cystatin Interaction by Intensity Fading MALDI-TOF-MS". *Protein J* (2008) 27:7–12. DOI 10.1007/s10930-007-9102-3.
11. Villanueva J, Yanes O, Querol E, Serrano L, Aviles FX, "Identification of protein ligands in complex biological samples using intensity-fading MALDI-TOF mass spectrometry." *Anal Chem*. 2003 Jul 15;75(14):3385-95.
12. Yanes O, Villanueva J, Querol E, Aviles FX. Detection of non-covalent protein interactions by 'intensity fading' MALDI-TOF mass spectrometry: applications to proteases and protease inhibitors. *Nat Protoc*. 2007;2(1):119-30.