Journal de la Société de Biologie, 195 (2), 143-150 (2001)

Les inhibiteurs d'élastases

par Michèle Reboud-Ravaux

Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire et Fonctionnelle, Département de Biologie Cellulaire
Institut Jacques Monod, CNRS-Universités Paris VI et VII, 2 place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05
E-mail : reboud@ccr.jussieu.fr – Tél. 33 1 44 27 50 78 – Fax. 33 1 44 27 59 94

Reçu le 4 avril 2001

RÉSUMÉ

L'élastase leucocytaire NE, localisée dans les granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles, est impliquée dans la phagocytose. Dans les conditions physiologiques normales, elle est contrôlée majoritairement dans le plasma par l'inhibiteur macromoléculaire α_1-PI (anciennement appelé α_1-antitrypsine). Dans certaines conditions pathologiques, un déséquilibre d'origine génétique ou fonctionnelle (oxydation par la fumée de cigarette par exemple) peut être à l'origine d'un excès d'élastase non contrôlé qui dégrade des constituants architecturaux essentiels de la matrice extracellulaire. Ainsi, l'élastase est impliquée dans la pathogenèse de l'emphysème pulmonaire. Son intervention est certaine dans d'autres processus inflammatoires. Le développement d'inhibiteurs synthétiques de faible poids moléculaire, spécifiques de cette enzyme et présentant une bonne biodisponibilité, est un domaine actif de la recherche académique et de la recherche pharmaceutique.

SUMMARY Elastase inhibitors

The serine proteinase elastase is located in the azurophil granules of mature circulating polymorphonuclear neutrophils. This neutrophil elastase or NE is a potent non specific serine protease which plays a role as bactericidal agent and in the degradation of immune complexes by intraphagosomal processes. It promotes inflammation when the granule contents are secreted in the extracellular environment. In certain pathological circumstances, an imbalance between NE and its major plasmatic inhibitor α^1-PI (formely, α^1-antitrypsin) leads to abnormal tissue destruction and disease development. Genetic or acquired α1-PI deficiency is thought to be involved in the pathogenesis of pulmonary emphysema. A variety of degenerative and degradative disorders are also associated to uncontrolled proteolysis by NE (rheumatoid athritis, glomerulonephritis, adult respiratory distress symptom, psoriasis, cancer). Numerous inhibitors of NE have been reported. Various molecules are currently undergoing clinical trials for emphysema and other pulmonary diseases.

Le terme d'élastase (à l'origine, enzyme capable de dégrader l'élastine) est une dénomination qui recouvre des enzymes très diverses appartenant à différentes classes de protéases (protéases à sérine et à cystéine, métalloprotéases) (Robert & Hornebeck, 1989; Bieth, 1989). Leur origine est également variée (animaux, bactéries, champignons). Cette revue se limitera aux inhibiteurs des élastases à sérine, notamment l'élastase pancréatique (EC 3.4.21.36) et l'élastase leucocytaire (EC 3.4.21.37) de Mammifères, en se concentrant plus particulièrement sur l'élastase leucocytaire humaine qui est une cible thérapeutique importante.

RÔLE PHYSIOLOGIQUE ET IMPLICATION DANS DES PATHOLOGIES

L'élastase leucocytaire ou élastase des neutrophiles NE est une glycoprotéine localisée dans les granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles. La stimulation de ceux-ci par des facteurs chimiotactiques entraîne leur sortie des capillaires vers l'espace extravasculaire. Il s'agit d'une réaction physiologique à l'invasion microbienne et cela constitue la partie initiale de la réponse inflammatoire (Larsen & Henson, 1983; Movat *et al.*,

1985). Les neutrophiles s'accumulent donc au niveau des microbes, la dégranulation se produit et la lyse résulte de la libération extracellulaire d'hydrolases (dont la NE) et d'oxydases comme la myéloperoxydase (Fig. 1) (Cochrane, 1968). La NE participe aussi avec d'autres protéases (cathepsine G, protéinase 3, collagénase MMP8, gélatinase MMP9) à la dégradation d'agents infectieux inernalisés pendant la phagocytose (Fig. 1). L'importance de son rôle dans la défense de l'hôte a été récemment soulignée. Les bactéries Gram négatif sont tuées en présence de NE, celle-ci catalysant spécifiquement l'hydrolyse de la protéine A présente dans la membrane externe (Belaaouaj *et al.*, 2000) ce qui correspond à un mécanisme non oxydatif tuant la bactérie. Lorsqu'elle est libérée dans le milieu extracellulaire, la NE est capable de dégrader des constituants architecturaux de la matrice extracellulaire tels que l'élastine ou le collagène IV ainsi que des protéines plasmatiques telles que les immunoglobulines ou des facteurs de la coagulation (Fig. 1). La NE contribue ainsi au déplacement des polynucléaires neutrophiles vers les lieux d'inflammation.

Si la NE peut intervenir dans un certain renouvellement des protéines qu'elle est susceptible de dégrader, leur hydrolyse reflète la plupart du temps un processus pathologique. En effet, dans les circonstances normales, l'activité de la NE est étroitement contrôlée par des inhibiteurs naturels, que ce soit au niveau plasmatique (Travis et Salvesen, 1983), principalement par l'α_1-PI (ou α_1-antitrypsine qui est une serpine de 394 acides aminés, 1,3 mg/mL de plasma), accessoirement par l'α_2-macroglobuline, ou au niveau local par l'inhibiteur protéique du mucus ou MPI (107 acides aminés, trouvé dans le poumon) et l'élafine (57 acides aminés, localisée dans le poumon et la peau) (Tableau I). Dans certaines conditions pathologiques, cet équilibre peut être rompu, en particulier lorsque le taux de α_1-PI est trop bas (Fig. 2). Cette déficience peut être génétique (transmission autosomique récessive) ou fonctionnelle due à une oxydation naturelle ou provoquée (par la fumée de cigarette par exemple) de l'α_1-PI. La méthionine 358 du site réactif de l'inhibiteur est alors oxydée (Fig. 3), ce qui entraîne une diminution de la constante de vitesse d'association à l'enzyme k_{ass} qui passe de 10^7 $M^{-1}.s^{-1}$ pour la forme native à 10^4 $M^{-1}.s^{-1}$ (Travis et Salvesen, 1983). L'inhibiteur macromoléculaire devenu moins affine est un moins bon compétiteur vis-à-vis des substrats naturels (élastine notamment). De nombreux variants de l'α_1-PI (90) ont été identifiés, la plupart menant à des activités inhibitrices normales. La mutation Glu342Lys associée à l'allèle PiZ se traduit, chez les homozygotes, par une accumulation de l'α_1-PI dans le foie qui n'est plus excrété. Le taux d'inhibiteur circulant représente 10 à 15 % du taux normal. L'excès d'élastase entraîne la dégradation de différents substrats de celle-ci, ce qui

TABLEAU I. – Les inhibiteurs macromoléculaires de protéases des polynucléaires neutrophiles. PR3 : protéinase-3 ; CG : cathepsine G.

	Poids moléculaire (kDa)	NE	PR3	CG
α_1-PI	52	+	+	+
Elafine	6	+	+	-
MPI	11	+	+	+
α_2-macroglobuline	4 x 178	+	+	+

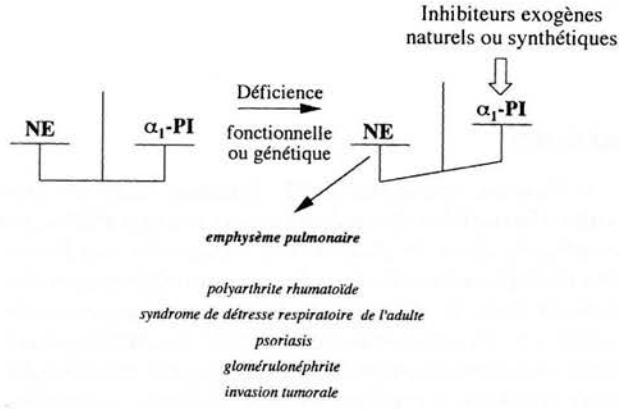


FIG 2. – L'hypothèse du déséquilibre NE/α_1-PI.

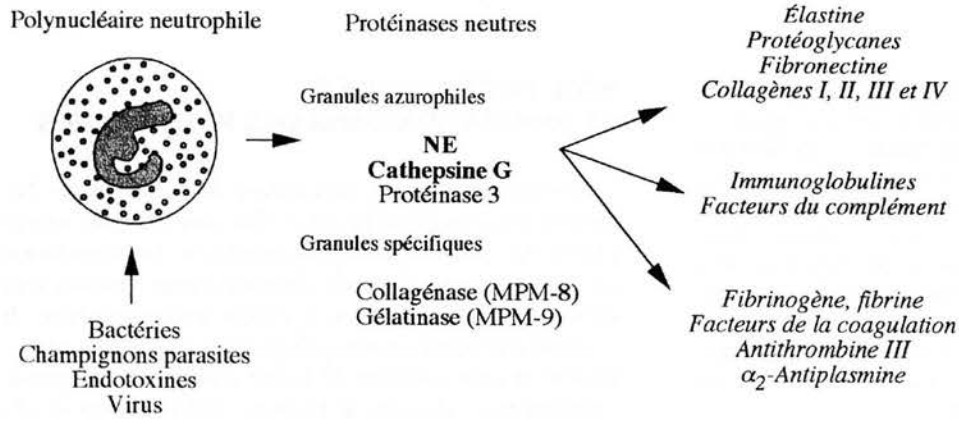


FIG. 1. – Rôles de la NE.

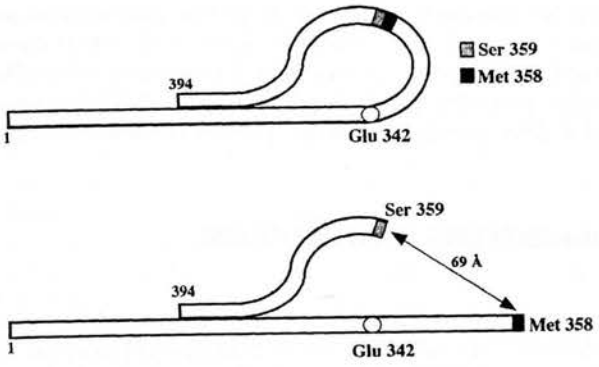


FIG. 3. – Représentation schématique de l'α_1-PI (adapté de Carrell & Travis, 1985).
La coupure par la NE de la boucle exposée de l'inhibiteur macromoléculaire (entre la Met358 et la Ser359) s'accompagne d'un changement très important de conformation au cours duquel la boucle coupée s'insère dans le feuillet ßA de l'inhibiteur (Mellet & Bieth, 2000). L'inhibiteur coupé dans lequel 69 Å séparent la Met358 et la Ser 58 présente, contrairement à la forme native, de l'affinité pour le récepteur situé à la surface des hépatocytes permettant ainsi l'internalisation du complexe irréversible NE/α_1-PI hydrolysé.

engendre des troubles pathologiques dégénératifs et inflammatoires tels que l'emphysème pulmonaire (dégradation des fibres élastiques du tissu pulmonaire). En effet, cette hypothèse du déséquilibre protéase-antiprotéase est généralement admise dans la pathogenèse de l'emphysème pulmonaire (Janoff, 1985) bien que probablement simplificatrice. L'implication des métalloprotéinases de matrice ou MMP est également évoquée (Snider, 1987) ; chez les patients déficients en α_1-PI, le développement d'emphysème pourrait être lié à une autre déficience d'inhibiteur de NE (MPI/élafine, Knight *et al.*, 1997). Un excès d'élastase est aussi impliqué dans un grand nombre d'autres pathologies : syndrome de détresse respiratoire de l'adulte ou ARDS (Parsons *et al.* 1995), bronchite chronique (Snider, 1987), arthrite rhumatoïde (Momohara *et al.* 1997), mucoviscidose (Greenberger, 1997), psoriasis (Galliocho & Savige, 1991), cancer (Noël *et al.,* 1997).
Dans l'espoir de modérer l'effet de la NE dans ces maladies, et donc d'obtenir des effets thérapeutiques bénéfiques, deux voies sont explorées pour remplacer l'α_1-PI : (a) l'utilisation de l'inhibiteur naturel purifié ou d'inhibiteurs recombinants ; (b) l'élaboration d'inhibiteurs synthétiques de faible poids moléculaire.
La conception d'inhibiteurs synthétiques spécifiques de la NE s'appuie sur la connaissance du *mécanisme d'action* de l'enzyme et de ses *propriétés structurales*. Les *inhibiteurs naturels* constituent aussi une source d'inspiration.

INHIBITEURS MACROMOLÉCULAIRES

Afin d'augmenter la protection du tissu élastique de patients présentant une déficience génétique en α_1-PI et ainsi éviter l'installation de l'emphysème pulmonaire, une stratégie de remplacement de l'inhibiteur macromoléculaire manquant peut être mise en place. Des injections d'α_1-PI humain purifié et chauffé (Prolastin) sont administrées à des malades, à raison de 60 mg/kg, ce qui permet de ramener à la normale le niveau anti-élastase du fluide des voies respiratoires basses. L'effet sur l'installation de la pathologie au long cours que constitue l'emphysème pulmonaire demeure cependant difficile à apprécier. Des α_1-PI recombinantes ont été produites chez *E. coli* et chez la levure dans lesquelles la Met358 a été remplacée par une Val afin d'empêcher l'oxydation (George *et al.*, 1984 ; Travis *et al.*, 1985). Cependant, les formes obtenues ont des durées de vie trop courtes car non glycosylées (Travis *et al.*, 1985). Deux autres voies de production d'a_1-PI recombinants ont été explorées : expression dans des cellules épithéliales du tractus respiratoire et *in vivo* (rat) à l'aide d'un vecteur adénovirus (Gilardi *et al.*, 1990 ; Rosenfeld *et al.*, 1991) ; production chez des animaux transgéniques (lait de souris ou de mouton) (Archibald *et al.*, 1990). Une pré-élafine recombinante a également été produite ; active, elle présente le même profil d'inhibition de différentes protéases à sérine que l'élafine mature (Bourbonnais *et al.*, 2000).
D'autres macromolécules d'origine animale sont aussi des inhibiteurs de la NE comme l'ovomucoïde de Dindon (troisième domaine, Bode & Huber, 1992) ou l'égline c (protéine de 70 acides aminés issue de la sangsue *Hirudo medicinalis* ne possèdant pas de site d'oxydation, Schnebli *et al.* 1985).

STRUCTURE DE LA NE ET MÉCANISME D'ACTION

La NE est une glycoprotéine globulaire de 218 acides aminés, formée de deux tonneaux β-antiparallèles (Bode *et al.*, 1989). Le site actif est à la jonction des deux domaines et comporte la triade catalytique Ser195/His57/Asp102. Comme toutes les protéases, la NE a un centre actif étendu (Fig. 4). Le substrat peptidique forme

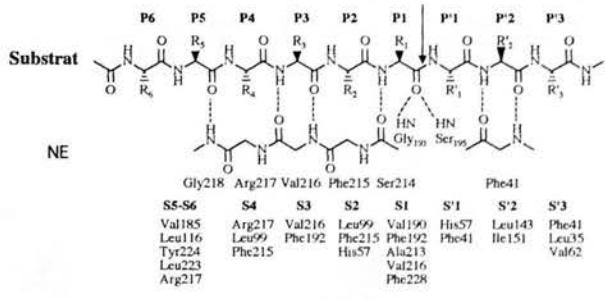


FIG. 4. – Représentation schématique de l'interaction de la NE avec les substrats peptidiques (adapté de Bode *et al.*, 1989). La flèche indique la liaison scissile. La nomenclature de Schechter et Berger est utilisée pour la fixation des différentes résidus aminoacides P1...Pn, P'1...P'n aux sous-sites de spécificité S1...Sn, S'1...S'n (Schechter & Berger, 1967).

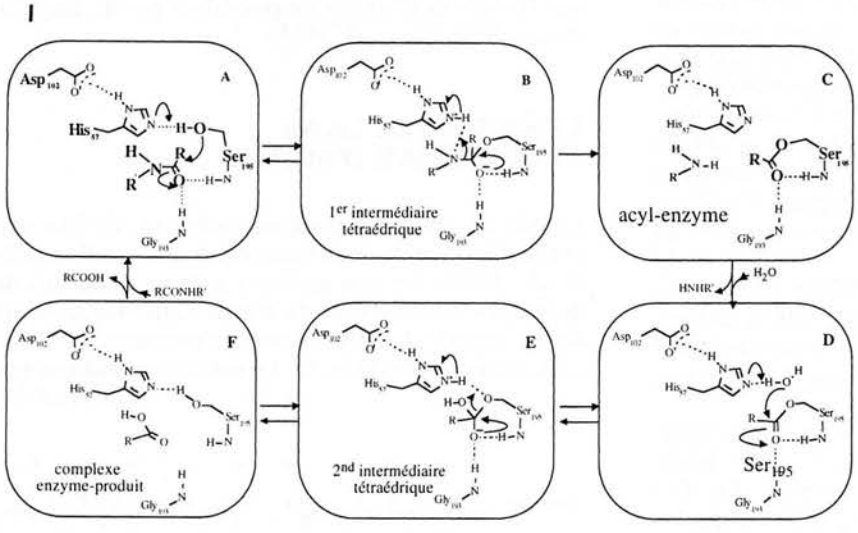
un feuillet β-antiparallèle avec les acides aminés du site actif. Le carbonyle du résidu P1, en amont de la liaison à couper, est maintenu dans le trou oxyanion par deux liaisons hydrogène formées avec les groupes NH de la Ser195 et de la Gly193. Dans le cas de l'ELH, le résidu P1 est le plus souvent un petit résidu hydrophobe comme Ala ou Val interagissant avec le sous-site de spécificité primaire S1 de l'enzyme. Les résidus qui le précèdent se logent dans les sous-sites de spécificité secondaire S2-S5 formant une crevasse hydrophobe (Ying *et al.*, 1991) où des acides gras ou des triterpènes pourront se fixer. Cependant, on note la présence d'un résidu chargé positivement Arg217 dans le sous-site S5.

Les résidus catalytiques Ser195/His57/Asp102 (numérotation de la chymotrypsine) sont impliqués dans un système de liaison hydrogène (Fig. 5, I). L'Oγ de la sérine active attaque le carbonyle de la liaison scissile pour former un intermédiaire tétraédrique, stabilisé au moyen de liaisons hydrogène par les groupes NH de la chaîne principale de la Gly193 et de la Ser195 (trou oxyanion). La décomposition de l'intermédiaire tétraédrique conduit à la libération de la portion amine du substrat et à la formation d'un acyl-enzyme. Puis, l'hydrolyse de l'acyl-enzyme en enzyme active avec libération de la portion acide du substrat se produit par formation d'un autre intermédiaire tétraédrique.

La NE comme la cathepsine G est une protéine basique (pI > 9 et > 11 respectivement, Bode *et al.*, 1989) qui se lie à la membrane cellulaire et à la matrice extracellulaire, propriété qui explique certainement l'importance des deux enzymes dans les processus inflammatoires.

INHIBITEURS SYNTHÉTIQUES

La recherche d'inhibiteurs de l'élastase NE est un domaine très actif, tant sur le plan académique que sur le plan industriel (Edwards & Bernstein, 1994 ; Leung *et al.* 2000). L'objectif est de trouver des inhibiteurs efficaces de faible poids moléculaire les plus sélectifs possible et présentant une bonne biodisponibilité. Les recherches rationnelles sur ces inhibiteurs s'appuient sur les connaissances structurales et mécanistiques qui viennent d'être décrites. Ces inhibiteurs se répartissent en deux grands groupes (classification de Krantz, Krantz, 1992) : inhibiteurs réversibles formant un complexe non covalent avec l'enzyme (analogues de substrats et analogues de l'état de transition) ; inhibiteurs irréversibles formant une liaison covalente avec l'enzyme, même si quelquefois cette liaison peut être labile comme dans le cas des acyl-enzymes stables.



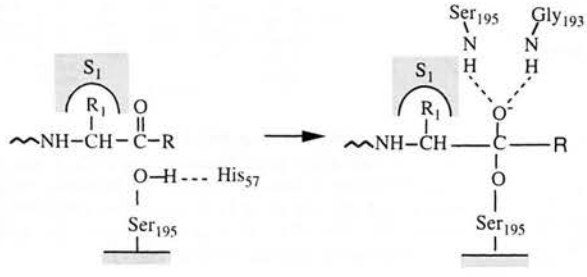


FIG. 5. – **I.** Mécanisme d'hydrolyse enzymatique des substrats par les protéases à sérine (d'après Warshel *et al.*, 1989). **II.** Conception d'analogues d'état de transition se fondant sur le mécanisme. Un carbonyle électrophile d'un aldéhyde peptidique (R = H) ou d'une trifluorométhylcétone (R = CF_3) conduit, après attaque par la sérine active, à un intermédiaire tétraédrique stabilisé par deux liaisons hydrogène impliquant les groupes NH des acides aminés Ser_{195} et Gly_{193} (trou oxyanion).

La grande réactivité de la sérine$_{195}$ en fait une cible majeure d'inhibition : beaucoup d'inhibiteurs synthétiques sont en effet conçus afin d'exploiter cet avantage. C'est le cas des *analogues de l'état de transition* où, en définitive, le complexe réversible enzyme-inhibiteur mime les intermédiaires tétraédriques se formant transitoirement dans le processus d'hydrolyse des liaisons peptidiques. L'attaque par la sérine active du carbonyle d'aldéhydes peptidiques ou de trifluorométhylcétones, conduit à la formation de l'intermédiaire tétraédrique (Fig. 5 II). L'intervention de la sérine active est également prévue lors de la conception d'*inhibiteurs suicides* (se référer à la figure 7).

Si actuellement aucun inhibiteur d'élastase n'est utilisé en thérapeutique, un nombre important d'entre eux sont en cours d'essais cliniques pour le traitement de l'emphysème pulmonaire ou d'autres pathologies touchant le poumon. Quelques-unes de ces molécules (**1-8**) sont présentées sur la figure 6. Il s'agit de dérivés d'hétérocycles ou de dérivés présentant un carbonyle électrophile, susceptible d'agir sur la sérine active conduisant ainsi à un analogue d'état de transition. Certaines molécules très efficaces comme la trifluorométhylcétone peptidique **1** ont dû être abandonnées à cause de leur médiocre biodisponibilité (Williams *et al.*, 1991). Des trifluorométhylcétones non peptidiques sont proposées

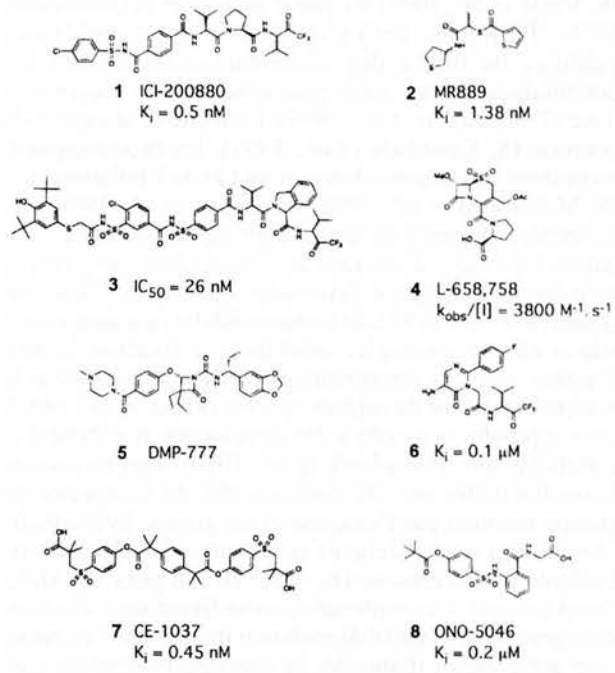
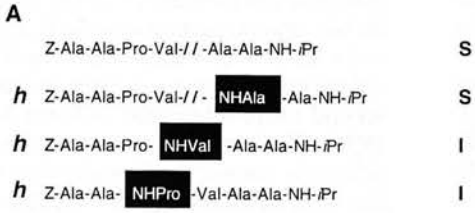
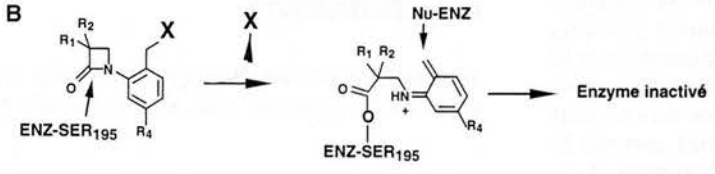


FIG. 6. – Structure d'inhibiteurs synthétiques de l'élastase NE.





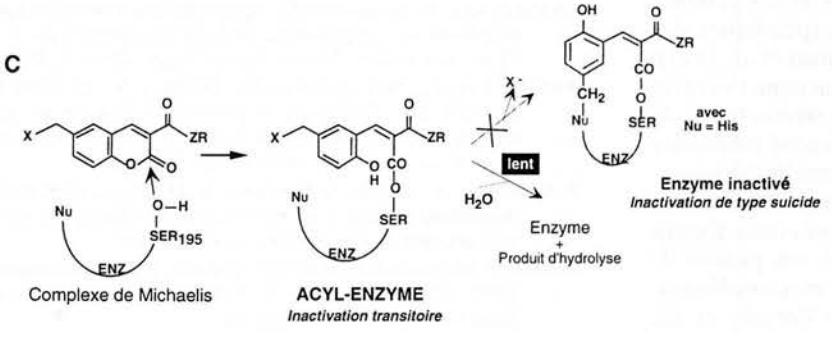


FIG. 7. – Conception d'inhibiteurs de l'élastase NE. **A**. Hydrazinopeptides, analogues de substrats. ***h*** : hydrazinopeptide ; S : substrat ; I : inhibiteur. **B** et **C**. Substrats suicides de nature ß-lactamique (**B**) ou coumarinique (**C**). X : bon groupe partant (**B**), mauvais groupe partant ou groupe non partant (**C**) ; R1, R2 : halogènes activant le carbonyle de l'amide cyclique ; Z : oxygène ou, moins fréquemment, soufre ; R = cycle aromatique (benzénique ou pyridinique) substitué ou non par le chlore. Dans la série coumarinique, une inactivation transitoire (formation d'une acyl-enzyme stable) et spécifique de la NE est observée pour les dérivés coumariniques présentant un mauvais groupe partant ou dépourvus de groupe partant.

(**6**, Veale *et al.*, 1995) en vue d'améliorer la biodisponibilité. Parmi les autres molécules non peptidiques publiées, on trouve des inhibiteurs ayant montré des potentialités intéressantes pour combattre la mucoviscidose (**7**, Anderson *et al.*, 1999), l'arthrite et le cancer du poumon (**8**, Kawabata *et al.*, 1991), les broncho-pneumopathies chroniques obstructives (**2**) ou l'inflammation (**5**, Macdonald *et al.*, 1998 ; Anderson *et al.*, 1999). La molécule **3** présente de façon originale une double potentialité, inhibiteur d'élastase et anti-oxydant, les espèces activées de l'oxygène favorisant l'action de l'élastase (Portevin *et al.*, 1997). Si certains inhibiteurs sont réversibles (**2** par exemple, inhibiteur à fixation lente), d'autres inhibent irréversiblement l'enzyme comme le composé **4** dérivé de céphalosporine (Finke *et al.*, 1992). Une approche originale a été développée par Robert et collaborateurs (Hornebeck *et al.*, 1989). Des molécules bifonctionnelles ont été conçues afin de comporter un groupe reconnu par l'enzyme et un groupe hydrophobe (dérivé de l'acide oléique) conférant à la molécule de l'affinité pour l'élastine [$K_i = 0{,}7.10^{-7}$ M pour Ol(Ala)$_3$-Pro-Alaninal]. Ces molécules, en se fixant sur l'élastine, protègent celle-ci de la dégradation induite par l'enzyme. Une autre façon d'aborder la conception d'inhibiteurs de protéases est de créer des molécules pseudopeptidiques résistant à l'hydrolyse. La synthèse originale de plusieurs *hydrazinopeptides* ***h*** (Fig. 7A) a permis de montrer que, selon la place occupée par le résidu de l'acide α-hydraziné, les hydrazinopeptides ne sont plus des substrats (S) mais deviennent des inhibiteurs réversibles (I) de l'élastase leucocytaire (Guy *et al.* 1998).

Le principe de l'inhibition suicide a été appliqué dans un certain nombre de cas (Fig. 6, composé **4** ; fig. 7 B et C). L'acylation de l'enzyme, par suite de l'attaque par la Ser_{195} d'un groupe carbonyle de l'inhibiteur, permet le démasquage d'une fonction électrophile latente qui va réagir avec un nucléophile porté par un acide aminé du site actif. Ainsi l'enzyme est définitivement inactivée par suite de la formation d'un complexe bi-ponté entre l'enzyme et l'inhibiteur. De tels inhibiteurs sont susceptibles de présenter une spécificité maximale puisque, après l'étape de reconnaissance, l'enzyme commence le cycle catalytique (étape spécifique) conduisant à la formation de l'entité réactive au niveau même du site actif de l'enzyme. En plus des céphalosporines comme le composé **4** et de dérivés de pénicillines (Thompson *et al.*, 1993), des ß-lactames monocycliques ont été développés (Maillard *et al.*, 1990 ; Knight *et al.*1992). Ainsi, les N-aryl azétidin-2-ones sont des ß-lactames monocycliques agissant en tant que substrats suicides spécifiques des élastases (Maillard *et al.*, 1990 ; Wakselman *et al.*,1991). L'influence des substituants du cycle ß-lactame (Vergely *et al.*, 1995 ; Joyeau *et al.*, 1996) et de la stéréochimie du carbone 3 (Doucet *et al.*, 1997) sur l'efficacité inhibitrice a été étudiée. Des analyses conformationnelles systématiques combinées à des calculs de mécanique moléculaire ont été effectuées pour les complexes présumés formés avec l'élastase leucocytaire humaine et ont permis de confirmer les résultats biochimiques et cristallographiques (alkylation de l'histidine-57) (Vergely *et al.*, 1996). De faible toxicité aiguë, un de ces ß-lactames exerce un effet protecteur modéré vis-à-vis de deux pathologies expérimentales induites par l'élastase leucocytaire (microhémorragie intradermique cutanée chez le Cobaye ; emphysème pulmonaire chez le Rat) (Maillard *et al.*, 1992).

D'autres hétérocycles ont conduit à des inhibiteurs dont l'action se fonde sur ce mécanisme : dérivés d'isocoumarines (Kerrigan *et al.*, 1995), benzisothiazolinones (Hlasta *et al.*, 1995) et plus récemment, dérivés de coumarines (Doucet *et al.*, 1999). Les dérivés coumariniques constituent une série de molécules non peptidiques caractérisée par une synthèse facile, une grande efficacité et une extrême sensibilité aux variations structurales (nature de X, substitutions sur le cycle aromatique R, Fig. 7C) qui influencent non seulement la spécificité mais aussi le mécanisme d'inhibition de l'enzyme ciblée (substrat suicide ou inactivation transitoire via la formation d'une acyl-enzyme stable). Si X est un mauvais groupe partant ($OCOCH_3$ par exemple) et R une pyridine substituée par un chlore, une inactivation transitoire et spécifique de l'élastase leucocytaire est observée (Doucet *et al.*, 1999 ; Pochet *et al.*, 2000), sans effet notamment sur les protéases à sérine de spécificité chymotrypsique comme la cathepsine G ou de spécificité trypsique comme la thrombine. Il y a formation rapide d'un acyl-enzyme ($k_{inact}/ K_I = 100.000\ M^{-1}.s^{-1}$) dont la déacylation est lente. Par contre, certaines molécules de cette nouvelle classe d'inhibiteurs généraux des protéases à sérine constituent, lorsque X est un bon groupe partant comme le chlore, les substrats suicides les plus efficaces décrits pour des enzymes de spécificité chymotrypsique, avec des constantes de vitesse de second ordre atteignant $762.000\ M^{-1}.s^{-1}$ (Pochet *et al.*, 1996). Plusieurs molécules sont des agents anticancéreux potentiels comme le démontre leur effet anti-invasif dans des tests cellulaires et des modèles animaux d'invasion tumorale (Kempen *et al.*, 2000).

REMERCIEMENTS

Je remercie Nicole Boggetto de l'aide très précieuse qu'elle m'a apportée lors de la rédaction du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

Anderson G.P. & Shinagawa K. Neutrophil elastase inhibitors as treatment for emphysema and chronic bronchitis. *Curr. Opin. Anti-inflam. Immun. Invest Drugs*, 1999, *1*, 29-38.

Archibald A. L., McClenaghan M., Hornsey V., Simons J. P. & Clark A. J. High-level expression of biologicaly active human α1-antitrypsin in the mik of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, *87*, 5178-5182.

Belaaouaj A. A., Kim K. S. & Shapiro S. D. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science*, 2000, *289*, 1185-1187.

Bieth J. G. Mechanism of action of elastases. Elastin and elastases. 1989, *vol. II*, CRC Press, L. Robert & W. Hornebeck, Eds, Boca Raton, Florida, pp. 13-20.

Bode W. & Huber R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* 1992, *204*, 433-451.

Bode W., Meyer E. J. & Powers J. C. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase : X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry*, 1989, *28*, 1951-1963.

Bourbonnais Y., Larouche C. & Tremblay G. M. Production of full-length human pre-elafin, an elastase specific inhibitor, from yeast requires the absence of functional yapsin 1 (Ysp1p) endoprotease. *Protein Expr. Purif.*, 2000, *20*, 485-491.

Carrell R. & Travis J. α1-Antitrypsin and the serpins : variation and countervariation. *TIBS*, 1985, 20-24.

Cochrane C. G. Immunologic tissue injury mediated by neutrophil leukocytes. *Adv. Immunol.*, 1968, *9*, 299-308.

Doucet C., Pochet L., Thierry N., Pirotte B., Delarge J. & Reboud-Ravaux M. 6-substituted 2-oxo-2*H*-1-benzopyran-3-carboxylic acid as a core structure for specific inhibitors of human leukocyte elastase. *J. Med. Chem.*, 1999, *42*, 4161-71.

Doucet C., Vergely I., Reboud-Ravaux M., Guilhem J., Kobaiter R., Joyeau R. & Wakselman M. Inhibition of human leukocyte elastase by functionalized *N*-aryl 3,3-dihalogenoazetidin-2-ones. Stereospecific synthesis and chiral recognition of dissymmetrically C3 substituted ß-lactams. *Tetrahedron Asymmetry*, 1997, *8*, 739-751.

Edwards P. D. & Bernstein P. R. Synthetic inhibitors of elastase. *Med. Res. Rev.*, 1994, *14*, 127-194.

Finke P.E., Shah S.K., Ashe B.M., Ball R.G., Blacklock T.J., Bonney R.J., Brause K.A., Chandler J.O., Cotton M. & Davies P. *et al.* Inhibition of human leukocyte elastase. 4. Selection of a substitued cephalosporin (L-658,758) as a topical aerosol. *J. Med. Chem.* 1992, *35*, 3731-44.

Galliocho M. C. & Savige J. A., Detection of antimyeloperoxidase and antielastase antibodies in vasculitides and infection. *Clin. Exp. Immun.*, 1991, *84*, 232-237.

George P. M., Vissers M. C. M., Travis J., Wintherbourn C. C., Carrell R. W., A genetically engineered mutant of α_1-antitrypsin protects connective tissue from neutrophil damage and may be useful in lung disease. *Lancet*, 1984, *2*, 1426-1428.

Gilardi P., Courtney M., Pavirani A., Perricaudet M. Expression of human alpha1-antitrypsin using a recombinant adenovirus vector. *FEBS Lett.*, 1990, *267*, 60-62.

Greenberger P. A. Immunological aspects of lung diseases and cystic fibrosis. *Jama*, 1997, *278*, 1924-1930.

Guy L., Vidal J., Collet A., Amour A. & Reboud-Ravaux M. Design and synthesis of hydrazinopeptides and their evaluation as human leukocyte elastase inhibitors. *J. Med. Chem.* 1998, *41*, 4833-43.

Hlasta D.J., Ackerman J.H., Court J.J., Farrel R.P., Johnson J.A., Kofron J.L., Robinson D.T., Talomi T.G., Dunlap R.P. & Francke C.A. A novel class of cyclic beta-dicarbonyl leaving groups and their use in the design of benzisothiazolone human leukocyte elastase inhibitors. *J. Med. Chem.* 1995, *38*, 4687-92.

Hornebeck W., Moczar E. & Robert L. Targeted bifunctional elastase inhibitors. Elastin and elastases. 1989, vol. II, CRC Press, Boca Raton, Florida.

Janoff A., Elastase in tissue injury. *Annu. Rev. Med.*, 1987, *36*, 207-216.

Joyeau R., Felk A., Guillaumé S., Wakselman M., Vergely I., Doucet C., Boggetto N. & Reboud-Ravaux M. Synthesis and inhibition of human leukocyte elastase by functionalized N-aryl azetidin-2-ones : effect of different substituents on the aromatic ring. *J. Pharm.Pharmacol.*, 1996, *48*, 1218-1230.

Kawabata K., Suzuki M., Sugitani M., Imaki K., Toda M. & Miyamoto T. ONO-5046, a novel inhibitor of human neutrophil elastase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, *177*, 814-20

Kempen I., Pochet L., Papapostolou D., Boggetto N., Doucet C., Masereel B., Foidart J.-M., Reboud-Ravaux M., Frankenne F et Pirotte B. (2000) Inhibition of cellular invasion by 3-chloromethyl 6-(acetoxymethyl)-2-oxo-2*H*-1-benzopyran-3-carboxylate. *Pflügers Arch – Eur J Physiol.*, 2000, *439*, R252.

Kerrigan J. E., Oleksyszyn J., Kam C. M., Selzler J. & Powers J. C. Mechanism-based isocoumarin inhibitors for human leukocyte elastase. Effects of the 7-amino substituent and 3-alkoxy group in 3-alkoxy-7-amino-4-chloroisocoumarins on inhibitory potency. *J. Med. Chem.* 1995, *38*, 544-52.

Knight W. B., Green B. G., Chabin R. M., Gale P., Maycock A.L., Weston H., Kuo D.W., Westler W.M., Dorn C. P. & Finke P.E. *et al.* Specificity, stability, and potency of monocyclic beta-lactam inhibitors of human leukocyte elastase. *Biochemistry*, 1992, *31*, 8160-70.

Knight K. R., Burdon J. G., Cook L., Brenton S., Ayad M. & Janus E. D. T. The proteinase-antiproteinase theory of emphysema : a speculative analysis of recent advances into the pathogenesis of emphysema. *Respirology*, 1997, *2*, 91-97.

Krantz A. A classification of enzyme inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1992, *2*, 1327-1334.

Larsen G. L. & Henson P. M. Mediators of inflammation. *Ann. Rev. Immunol.*, 1983, *1*, 335-359.

Leung D., Abbenante G. & Fairlie D. P. Protease inhibitors : current status and future prospects. *J. Med. Chem.*, 2000, *43*, 305-341.

Luisetti M., Sturani C., Sella D., Madonini E., Galavotti V., Bruno G., Peona V., Kucich U., Dagnino G., Rosenbloom J., Starcher B. & Grassi C. MR889, a neutrophil elastase inhibitor, in patients with chronic obstructive pulmonary disease : a double blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Eur. Respir. J.* 1996, *9*, 1482-6

Macdonald S. J., Belton D. J., Buckley D. M., Spooner J. E., Anson M.S, Harrison L. A., Mills K., Upton R. J., Dowle M. D., Smith R.A., Molloy C.R. & Risley C. Syntheses of trans-5-oxo-hexahydro-pyrrolo[3,2-b]pyrroles and trans-5-oxo-hexahydro-furo[3,2-b]pyrroles (pyrrolidine trans-lactams and trans-lactones) : new pharmacophores for elastase inhibition. *J. Med. Chem.* 1998, *41*, 3919-22

Maillard J. L., Favreau C., Reboud-Ravaux M., Kobaiter R., Joyeau J. & Wakselman M. Biological evaluation of the inhibition of neutrophil elastase by a synthetic beta-lactam derivative. *Eur. J. Cell. Biol.*, 1990, *52*, 213-218.

Maillard J. L., Favreau C., Vergely I., Reboud-Ravaux M., Joyeau R., Kobaiter R. & Wakselman M. Protection of vascular basement membrane and microcirculation from elastase-induced damage with a fluorinated β-lactam derivative. *Clin. Chim. Acta*, 1992, *213*, 75-86.

Mellet P. & Bieth J. G. Evidence that translocation of the proteinase precedes its acylation in the serpin inhibition pathway. *J. Biol. Chem.*, 2000, *275*, 10788-10795.

Momohara S., Kashiwazaki S., Inoue K., Saito S. & Nakagawa T., Elastase from polymorphonuclear leukocyte in articular cartilage and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.*, 1997, *16*, 133-140.

Movat H. Z. The acute inflammatory reaction. In : Inflammation, Immunity and Hypersensibility. H. Z. Movat, ed. 5, New York, USA : Elsevier), 1985, pp. 1-161.

Noël A., Gilles C., Bajou K., Devy L., Kebers F., Lewalle J. M., Maquoi E., Munaut C., Remacle A. & Foidart J. M. Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion metastasis*, 1999, *17*, 221-239.

Parsons P. E., Gillespie M. M., Moore E. E., Moore F. A. & Worthen G. S., Neutrophil response to endotoxin in the adult respiratory distress syndrome : role of CD14. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1995, *13*, 152-160.

Pochet L., Doucet C., Dives G., Wouters J., Masereel B., Reboud-Ravaux M. & Pirotte B. Coumarinic derivatives as mechanism-based inhibitors of α-chymotrypsin and human leukocyte elastase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2000, *8*, 1489-1501.

Portevin B., Lonchampt M., Canet E. & De Nanteuil G. Dual inhibition of human leukocyte elastase and lipid peroxydation : *in vitro* and *in vivo* activities of azabicyclo[2.2.2]octane and perhydroindole derivatives. *J. Med. Chem.* 1997, *40*, 1906-18.

Robert L. & Hoernbeck W. Elastin and elastases. 1989, *vol. II*, CRC Press, Boca Raton, Florida.

Rosenfeld M. A., Siegfried W., Yoshimura K., Yoneyama K., Fukayama M., Stier L. E., Pääkko P. K., Gilardi P., Stradford-Perricaudet L. D., Jallat S., Pavirani A., Lecocq J. P., Crystal R. G., Adenovirus-mediated transfer of a recombinant α_1-antitrypsin in the milk of transgenic mice. *Science*, 1991, *252*, 431-434.

Schechter I. & Berger A., On the size of the active site in proteases. I. papain. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1967, *27*, 157-162.

Schnebli H. P., Seemuller U., Fritz H., Mashler H., Liersch M., Virca G. D., Bodmer J. L., Snider G. L., Lucey E. C. & Stone P. G. Eglin c, a pharmacologically active elastase inhibitor. *Eur. J. Resp. Dis.*, 1985, *66*, (Suppl. 139), 66.

Snider G. L., Protease-antiprotease imbalance in the pathogenesis of emphysema and chronic bronchial injury : a potential target for drug development. *Drug Dev. Res.*,1987,*10*, 235-253.

Thompson K. R., Finke P. E., Shah S. K., Ashe B. M., Dahlgren M. E., Dellea P. S., Fletcher D. S., Hand K. M., Maycock A. L. & Doherty J. B. Inhibition of human leukocyte elastase. 7. Inhibition by 6-substitued penicillin amides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, *3*, 2289-94.

Travis J., Owen M., George P., Carrell R., Rosenberg S., Hallewell R. A. & Barr P. J. Isolation and properties of recombinant DNA produced variants of human alpha1-antiproteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 1985, *260*, 4384-4389.

Travis J. & Salvesen G. S. Human plasma proteinase inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.*, 1983, *52*, 655-709.

Veale C. A., Bernstein P. R., Bryant C. B., Ceccarelli C., Damewood J. R. Jr., Earley R., Feeney S. W., Green S. W., Gomes B., Kosmider B. J. & Steelman G. B. *et al.* Non-peptidic inhibitors of human leukocyte elastase.7. Design, synthesis, and X-ray cristallography of series of orally active 5-aminopyrimidin-6-one-containing trifluoromethyl ketones. *J. Med. Chem.* 1995,*38*, 98-108.

Vergely I., Laugaâ P. & Reboud-Ravaux M. Interaction of human leukocyte elastase with a *N*-aryl azetidinone suicide substrate : conformational analyses based on the mechanism of action of serine proteinases. *J. Mol. Graphics*, 1996, *14*, 158-167.

Vergely I., Okochi V., Golpayegani S., Reboud-Ravaux M., Kobaiter R., Joyeau R. & Wakselman M. Inhibition of human leucocyte elastase by functionalized *N*-aryl azetidin-2-ones : substituent effect at C3 and benzylic positions. *Eur. J. Med. Chem.*, 1995, *30*, 199-208.

Wakselman M., Joyeau R., Kobaiter R., Boggetto N., Vergely I., Maillard J., Okochi V., Montagne J. J. & Reboud-Ravaux M. Functionalized *N*-aryl azetidinones as novel mechanism-based inactivators of neutrophil elastase. *FEBS Lett.*, 1991, *282*, 377-381.

Warshel A., Naray S. G., Sussman F & Hwang J. K. How do serine protease really work? *Biochemistry*, 1989, *28*, 3629-3637.

Williams J. C., Stein R. L., Giles R. E. & Krell R. D. Biochemistry and pharmacology of ICI 200,880, a synthetic peptide inhibitor of human neutrophil elastase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1991, *624*, 230-43.

Ying Q. L., Rinehart A. R., Simon S. R. & Chironis J. C., Inhibition of human leukocyte elastase by ursolic acid. Evidence for a binding site for pentacyclic terpenes. *Biochem. J.*, 1991, 521-526.