Inhibidores de Termolisina como modelo de inhibición de metaloproteasas.

Yudith Cañizares Carmenate.

Unit of Computer-Aided Molecular "Biosilico" Discovery and Bioinformatic Research (CAMD-BIR Unit). Facultad Química-Farmacia, Universidad Central de Las Villas (UCLV), Santa Clara, 54830, Villa Clara, Cuba.

Resumen

La Termolisina es una metaloendopeptidasa de zinc, termoestable, aislada del *Bacillus thermoproteolyticus*, que ha sido utilizada como modelo farmacológico y biológico de algunas metaloproteasas de mamíferos como la Neprilisina y la enzima convertidora de Angiotensina, debido a la homología estructural y funcional encontrada en el sitio activo. Estas enzimas están involucradas en el metabolismo de péptidos vasoactivos para la regulación dela presión arterial, por lo que, los inhibidores de la Termolisina pueden ser considerados potenciales agentes terapéuticos. En esta revisión se incluyen, además, algunos estudios importantes para la comprensión del mecanismo inhibitorio así como la predicción de compuestos inhibidores de la Termolisina utilizando métodos teóricos.

Palabras claves: Metaloproteasa, Termolisina, Inhibidor, Fosforamidón, Enzima Convertidora de Angiotensina, Neprilisina.

Introducción

La Termolisina (TLN, *EC 3.4.24.27*) es una de las primeras metaloproteasas de la cual se obtuvo su estructura en solución cristalográfica y a partir de que la información estructural detallada de la enzima estuvo disponible, se ha estudiado extensivamente, como un ejemplar de las metaloendopeptidasas de zinc.[1]

La TLN es una enzima proteolítica extracelular, estable al calor, de peso molecular 34600, aislada de la bacteria gram-positiva *Bacillus thermoproteolyticus.*[2]

Contiene un ion de zinc esencial para la actividad catalítica y cuatro iones de calcio necesario para la estabilidad térmica. La enzima es específica para enlaces peptídicos que contienen residuos hidrófobos de aminoácidos como *L-leucina*, *L-isoleucina*, *valina* y *L-fenilalanina*, además es especialmente útil para la hidrólisis parcial de polipéptidos que no contengan *arginina* o *lisina* y se ha usado para la determinación de la secuencia de aminoácidos de péptidos y proteínas.[2, 3]

Figura 1: *Estructura de la Termolisina 3P7P obtenida de la base de datos de proteínas.*[4]

A continuación se muestra la secuencia de la Termolisina (UniProt P00800) extraída de la base de datos de proteínas[4].

>3P7P:E|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

ITGTSTVGVGRGVLGDQKNINTTYSTYYYLQDNTRGDGIFTYDAKYRTTLPGSLWADA
DNQFFASYDAPAVDAHYYAGVTYDYYKNVHNRLSYDGNNAAIRSSVHYSQGYNNAF
WNGSEMVYGDGDGQTFIPLSGGIDVVAHELTHAVTDYTAGLIYQNESGAINEAISDIFGT
LVEFYANKNPDWEIGEDVYTPGISGDSLRSMSDPAKYGDPDHYSKRYTGTQDNGGVHI
NSGIINKAAYLISQGGTHYGVSVVGIGRDKLGKIFYRALTQYLTPTSNFSQLRAAAVQSA
TDLYGSTSQEVASVKQAFDAVGVK

La Termolisina es sintetizada como una pre-proenzima que consiste en un péptido señal de 28 aminoácidos, un propèptido de 204 aminoácidos y la enzima madura contiene 316 aminoácidos de longitud. El péptido señal actúa como una señal de translocación de la pre-protermolisina hacia la membrana citoplasmática bacteriana. La prosequencia actúa como una chaperona molecular y conduce el autoclivaje del enlace peptídico entre la secuencia de la proenzima y la enzima madura. La proteína madura es secretada al medio extracelular[17].

En este artículo se resumirán las características de la enzima, sus inhibidores, su importancia como modelo farmacológico y biológico de otras metaloenzimas así como algunos estudios teóricos realizados para la identificación de compuestos inhibidores de la Termolisina.

Mecanismo catalítico de la Termolisina

Para sugerir cómo interactúa la enzima con su sustrato han sido utilizados análisis cristalográficos de los complejos enzima-inhibidor. El mecanismo de acción para la Termolisina fue propuesto por **B. W. Matthew** en 1988 en el que sugiere, a partir de una serie de estudios estructurales, que el ion zinc de la Termolisina nativa forma un complejo de coordinación con tres ligandos proporcionados por la proteína (*His 142*, *His 146* y *Glu 166*) y con un cuarto ligando proporcionado por una molécula de agua en la que el ion de zinc tiene dos funciones: polarizar el grupo carbonilo del sustrato y facilitar la desprotonación del agua nucleofílica.[13]

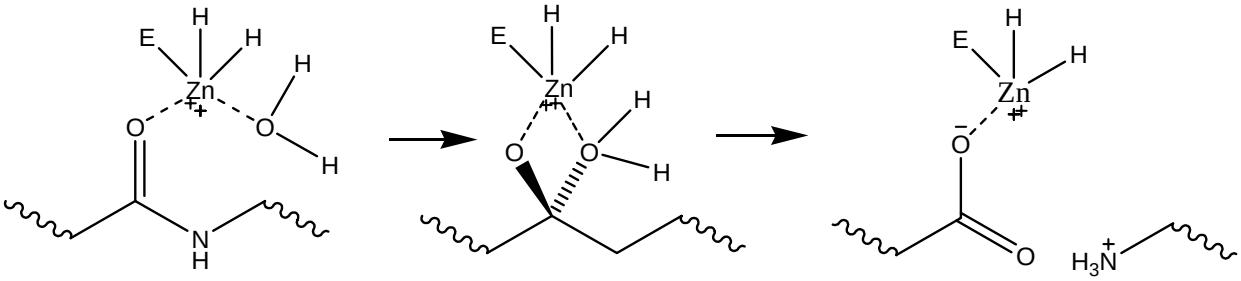


Figura 2: *Mecanismo de acción propuesto para la Termolisina*[1].

La escisión de los enlaces peptídicos catalizada por la Termolisina se lleva a cabo por un mecanismo básico dependiente del pH y la temperatura óptima para la enzima, con el ataque de una molécula de agua o de iones hidróxido al carbono carbonilo del enlace peptídico. El modelo detallado construido sugiere que el substrato entrante optimiza sus interacciones en los subsitios S_2, S_1, S_1' y, S_2' conduciendo la molécula de agua zinc-limitante hacia *Glu 143*. El carácter nucleofílico de esta molécula de agua podría reforzarse teniendo ambos protones de hidrógeno enlazados a *Glu 143* y, al mismo tiempo, teniendo el oxígeno ligado al zinc. Bajo influencia combinada del ion metálico y del glutamato, el agua ataca el carbono carbonilo para formar un intermediario pentacoordinado, posteriormente es aceptado el protón por *Glu 143* y entonces se transfiere inmediatamente la salida del nitrógeno. El oxígeno de la cadena lateral de *Asn 112* y el carbonilo de la cadena principal de *Ala 113* aceptan enlaces de hidrógeno del nitrógeno tetraédrico doble protonado formado por la ruptura del enlace. El paso de este producto intermedio a los productos es facilitado por una segunda transferencia del protón vía *Glu 143*. En este caso el protón es aceptado por el nitrógeno desde el péptido hidratado.

Se evidencia que la His 231 debe estar en su estado protonado para la catálisis lo cual es constante con la idea de que este residuo ayuda a estabilizar el estado de transición donando un enlace de hidrógeno al péptido hidratado.

Inhibidores de la Termolisina

Los inhibidores enzimáticos son considerados agentes quimioterapéuticos efectivos, ya que un análogo “no natural” del sustrato pude bloquear la acción de una enzima específica.

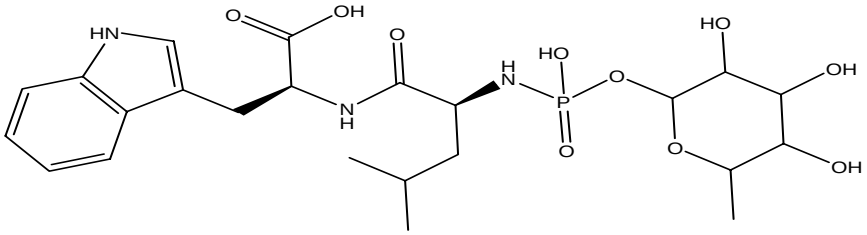
La constante de inhibición K_I puede ser utilizada como medida de la actividad de los inhibidores y teniendo en cuenta que de modo general los inhibidores de la Termolisina son inhibidores competitivos análogos del sustrato se puede definir la K_I según la ecuación de Michaelis-Menten:

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \qquad (1)$$

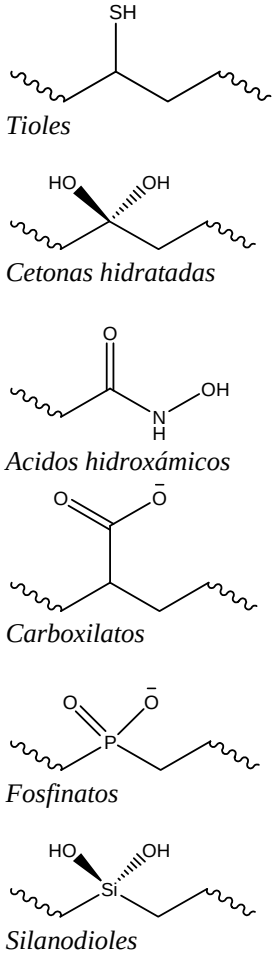
El inhibidor *I* se une reversiblemente a la enzima de modo que se forma un complejo enzima inhibidor *EI* catalíticamente inactivo, por consiguiente se reduce la concentración de enzima libre disponible para la fijación del sustrato.

El centro del diseño de inhibidores de metaloproteasas es la selección un grupo funcional que sea capaz de interactuar recíprocamente con el metal. Se han reportado una serie de inhibidores entre los que se destacan los *tioles* ya que presentan una actividad intrínseca por el zinc y han sido empleados comúnmente con esta actividad, las *cetonas hidratadas* consideradas útiles inhibidores de las metaloproteasas, los *ácidos hidroxámicos* capaces de formar una fuerte quelación del metal, además grupos aniónicos tales como *carboxilatos* y *fosfinatos* análogos del inhibidor natural fosforamodón en los que la carga proporciona una atracción coulómbica al catión del zinc. Los *silanodioles* son introducidos recientemente a partir de hidratados de carbono inestable, empleando un átomo de silicio central, el elemento más similar al carbono y también han resultado ser de gran utilidad.[1] Figura 3B.

El inhibidor tomado como referencia por la comunidad científica fue reportado en el año 1973, aislado a partir del *Streptomyces tanashiensis*, el fosforamidón[8](Figura 3A), ya que presenta una gran afinidad por el sitio activo de la enzima y se reporta una K_I = $2.8x10^{-8}$M.[9]



A



B

Figura 3: *A) Estructura química del Fosforamidón. B) Principales grupos funcionales encontrados en los inhibidores de la TLN.*

Existen varios inhibidores de la Termolisina reportados en la literatura con una notable diversidad estructural y además reportados como inhibidores de otras metaloproteasas como por ejemplo los inhibidores sintéticos *Tiorfan* y *Retrotiorfan*[10]; derivados peptídicos como el *CLT*, *Candoxatrilat* y *Omaprilat*, el cual fue sometido a ensayos clínicos en la terapéutica de enfermedades cardiovasculares;[11] péptidos; dipéptidos; así como, aminoácidos libres. Figura 4.

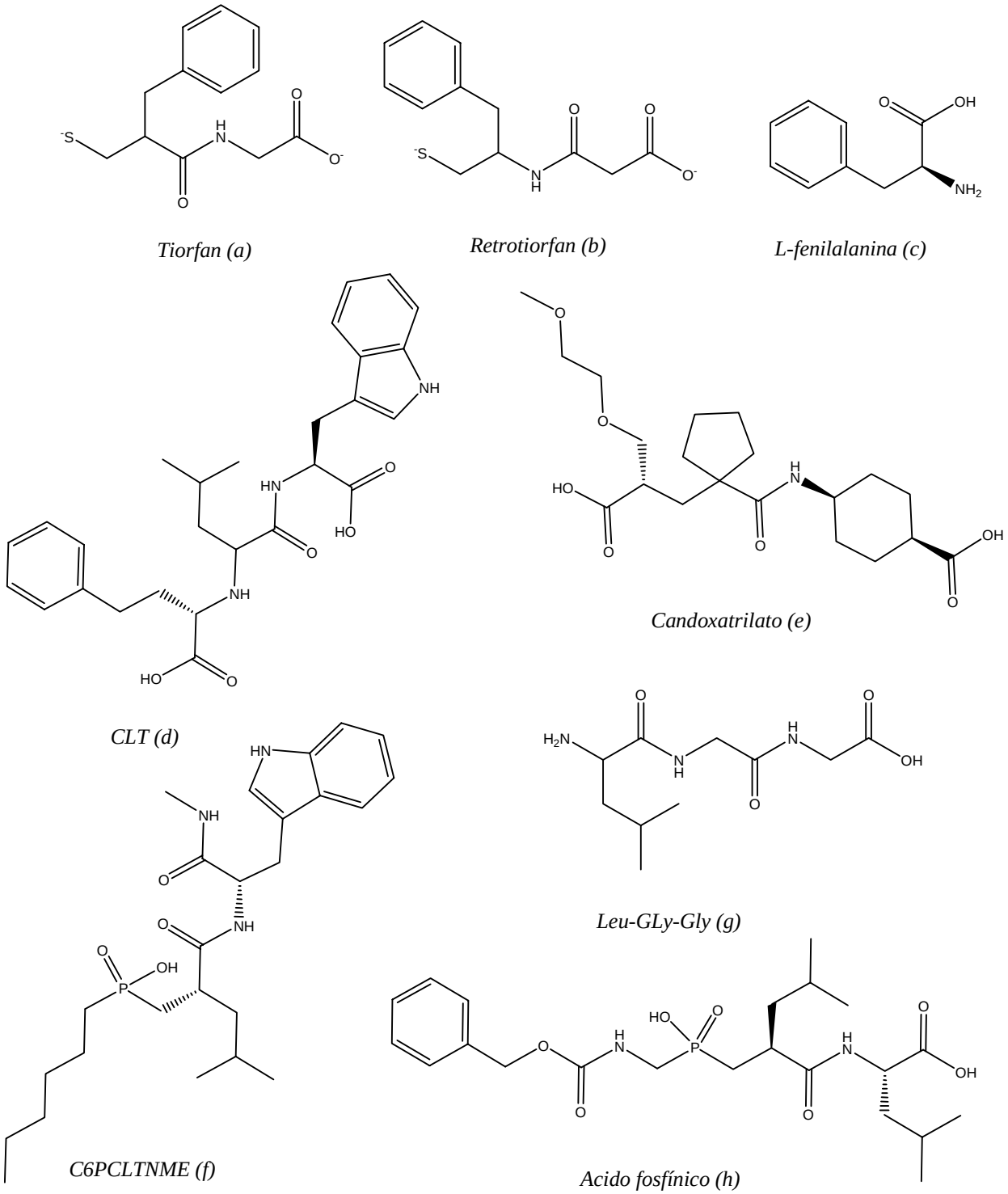


Figura 4: *Ejemplos de inhibidores de TLN reportados en la literatura. a) Tiorfan*[10]*, b) Retrotiorfan*[10]*, c) L-fenilalanina*[15]***,*** *d) CLT*[11]*, e) Candoxatrilato*[11]*, f) C6PCLTNME*[14]*, g) Leu-GLy-Gly*[15]*, h) Acido fosfínico*[16]*.*

Se realizaron además, estudios con diferentes alcoholes[12] como el metanol, el etanol, el alcohol terbutílico, entre otros; en los que la K_I oscila entre 35 y 430mM. Su pobre poder de inhibición esta dado a que el inhibidor se sitúa en los subsitios de anclaje S1 y S1' y no interactúa directamente con el zinc, por lo que pueden ser desplazados con facilidad por un inhibidor más fuerte o el sustrato natural.

Una medida para determinar la actividad relativa de los compuestos fue propuesta por **G. Klopman** y **R. Bendale** llevando los valores de K_I a una escala de rangos entre 10 y 99, donde los números en los rangos de 10 a 19 representa compuestos inactivos, del 20 al 29 marginalmente activos y de 30 en lo adelante moléculas activas[2], según la ecuación:

$$-\log(K_I) = 0{,}0500 * X - 1{,}522 \qquad (2)$$

Relación de los inhibidores de la Termolisina con otras metaloproteasas.

La familia TLN es la familia de proteasas M4 del clan de metaloproteasas MA[18] y la metaloproteasa de zinc secretada por la bacteria gram positiva *Bacillus thermoproteolyticus* es el prototipo de esta familia. Datos cristalográficos de la TLN y complejos TLN-inhibidor se han usado para modelar el sitio activo de otras enzimas de la familia de la TLN [19, 20].
Generalmente las enzimas que se encuentran en esta superfamilia presentan una estructura helicoidal homóloga a la de la TLN[6] y además dos secuencias estructurales generales *HExxH* y *ExxxD* que contienen aminoácidos implicados en el proceso catalítico en las metaloproteasas de zinc.[7]

Las metalopeptidasas de zinc juegan un papel muy importante en la biosíntesis y metabolismo de diferentes péptidos bioactivos y por tanto los inhibidores de estas enzimas pueden ser considerados agentes terapéuticos potenciales[11].

Existen otras enzimas que no pertenecen a la familia M4 sin embargo tienen una enorme similitud estructural y funcional con la TLN lo cual ha sido muy útil para la identificación de la interacciones del inhibidor con las metaloproteasas de zinc dentro del sitio activo[19, 21].

La enzima convertidora de Angiotensina (ECA, EC 3.4.15.1) pertenece a la familia M2 de las metaloproteasas y juega un importante papel en la homeostasia de la presión sanguínea clivando la Angiotensina-I para producir el potente vasopresor Angiotensina-II[22] e inactivando el péptido vasodilatador bradiquinina[23]. La ECA contiene el motivo HEXXH donde las dos histidinas forman dos de los tres ligandos mientras el glutamato forma el tercer ligando[24]. El papel del ion zinc en la catálisis de la ECA permite pensar que es análogo al de la TLN[25]. Como consecuencia de esta similitud estructural y funcional y el papel de la ECA en el metabolismo de dos péptidos

vasoactivos, el sitio active de la TLN ha sido usado como un modelo para desarrollar inhibidores de ECA altamente potentes y específicos, los que han sido empleados oralmente como fármacos activos en el tratamiento de patologías asociadas con el sistema cardiovascular como la hipertensión arterial y la insuficiencia cardiaca[26].

La Neprilisina (neutral endopeptidase; NEP, EC 3.4.24.11) es miembro de la familia M13 de las metaloproteasas de zinc[18]. Como la TLN y la ECA posee un motivo HEXXH así como una secuencia consenso EXXXD en el que el glutamato (Glu) sirve como tercer ligando del zinc[24]. La NEP esta involucrada en el metabolismo de un número de péptidos que regulan los sistemas cardiovascular, inflamatorio, nervioso e inmunológico de los mamíferos[27]. Por lo tanto la NEP es una diana terapéutica para el tratamiento de los trastornos cardiovasculares e inflamatorios. Antes de la obtención cristalina de la estructura del complejo enzima inhibidor la similitud de la estructura y función con la TLN sirvió como base para el diseño de inhibidores de NEP utilizando la termolisina como un modelo de prueba. Inhibidores selectivos como es el caso del fosforamidon ha contribuido a la comprensión de la función del la enzima nep[11].

Los méritos de la modelación de proteínas basado en la homología de estructuras conocidas han sido aplicados décadas atrás[28] y es claro que la construcción del modelo por homología es una técnica valiosa en la construcción de la estructura tridimensional de la proteína en la que la identidad de la secuencia con el modelo es alta[29].

Estudios teóricos sobre inhibidores de Termolisina

Los estudios teóricos están motivados fundamentalmente por el ahorro que representan en cuanto al tiempo de ensayo y recursos materiales. Se han reportado en la literatura una serie de estudios sobre la inhibición de la Termolisina que relacionan rasgos estructurales de los compuestos con la actividad inhibidora de la enzima.

En el año 1989 **G. Klopman** emplea el programa CASE (*Computer Automated Structure Evaluation*) para el análisis de la inhibición de la enzima Termolisina por una serie de 73 compuestos derivados de dipéptidos y polipéptidos. La contante de inhibición (Ki) fue usada como medida de la actividad de los inhibidores y el programa identificó satisfactoriamente fragmentos moleculares relevantes en la actividad inhibitoria de los péptidos, sin ninguna suposición acerca del mecanismo de inhibición. Utilizando los fragmentos principales fue realizado un estudio QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) en el que se obtuvieron ecuaciones de regresión lineal múltiple para la predicción de la actividad inhibitoria[2].

En 1993 **S. A. DePriest** y colaboradores utilizan la metodología CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*), un programa QSAR-3D (*three-dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship*), como una herramienta en el desarrollo de modelos predictivos para la Termolisina y la enzima Convertidora de Angiotensina, basados en la determinación de la

geometría deducida y experimental del sitio activo. Se obtuvo experimentalmente reglas de alineamiento basada en estructuras conocidas de complejos tridimensionales producidas por correlaciones predictivas para inhibidores de termolisina comparable, pero no superior, a la correlación para inhibidores de la ECA, basado en reglas de alineamiento que fueron deducidas computacionalmente. Las correlaciones indican que los QSAR-3D basados en reglas de alineamiento derivados solo de datas estructura-actividad pueden producir correlaciones predictivas estadísticamente significativas para compuestos no congenéricos bastante diversos[30].

En el año 2002 **N. Marchand-Geneste** y colaboradores unificaron técnicas ILP (*Inductive Logic Programming*) y regresión estándar para dar al método QSAR la fortaleza del ILP en la descripción estérica de la estructura con la familiaridad y la fuerza de los métodos se regresión. Se identificaron y usaron farmacóforos correlacionados con la actividad como nuevas variables indicativas a lo largo de la predicción CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*) para la formación de ecuaciones predictivas de regresión. Se comparó la formación del QSAR-3D utilizando un CoMFA estándar con el uso del ILP en el estudio de una base de datos bien estudiada de inhibidores de la Termolisina y Glucógeno fosforilasa. En cada caso la adición de las variables ILP producidas estadísticamente mejoran los resultados del análisis CoMFA. Además, las nuevas variables ILP no incrementan la complejidad de la ecuación QSAR final y dio la posibilidad de hacerse una idea del mecanismo de enlace de los complejos proteína-ligando bajo estudio[31].

Estudios más recientes desarrollados por **M. T. H. Khan** en el año 2009 permite identificar potentes inhibidores de la Termolisina usando cribado virtual basado en la estructura y ensayos de enlace. Fueron identificados 22 compuestos como posibles enlaces de la Termolisina basados en cribado virtual de estructuras con el software ICM (ICM-VLS). Ensayos de enlace in vivo confirmaron que 12 de ellos forman enlaces con la Termolisina y su modo de enlace fueron estudiados por *docking* molecular usando ICM y MVD (*Molegro Virtual Docker*). El inhibidor más potente tiene una IC_{50} de 6.4 x 10^{-8} mM (NSC250686, 1 beta-D-arabinofuranosil-N(4)-laurilcitosina). La estructura de este compuesto es muy diferente a los 11 restantes y 9 de los12 compuestos contienen un esqueleto químico similar (derivados de 3-nitrobenzamida) y tienen valores de IC_{50} en el rango de 697.48 a 0.047 mM. Los resultados de ICM-VLS y los perfiles de actividad (valores de IC_{50}) fueron comparados y se encontró cierta correlación lineal (R^2=0.78). Estudios cinéticos mostraron que, excepto para NSC285166 (oxiquinolina), los compuestos son inhibidores competitivos de la Termolisina[32].

Conclusiones

Teniendo en cuenta lo planteado anteriormente se puede concluir que los inhibidores de la enzima termolisina constituyen fármacos prometedores en el tratamiento de patologías tan comunes como la hipertensión arterial y la insuficiencia cardiaca por su homología con otras

enzimas de mamíferos consideradas dianas terapéuticas para dichas patologías como la ECA y la NEP.

Además, con el empleo de herramientas estadísticas y estudios QSAR, la identificación de nuevos inhibidores de metaloproteasas puede aumentar considerablemente con una disminución del tiempo de ensayo y recursos materiales.

Referencias

1. Juers D. H., Kim J., Matthews B.W., Sieburth S.M. **Structural Analysis of Silanediols as Transition-State-Analogue Inhibitors of the Benchmark Metalloprotease Thermolysin.** *Biochem*2005; 44: 16524-8.
2. Klopman G., Bendale R. D. **Computer Automated Structure Evaluation (CASE): A Study of Inhibitors of the Thermolysin Enzyme.** *J Theor Biol* 1989; 136: 67-77.
3. Lehninger A. Bioquímica 2005.
4. PDB (*Protein Data Bank*) disponible en: http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do
5. Baltora-Rosset S., Marty D., Dupradeau F. Y., Pauthe E., Larreta-Garde V., Gacel G. and Monti J. P. **Micro-environment effect on the structure of synthetic substrates of thermolysin.** *Letters in Peptide Science*1997; 4: 391–395.
6. Sturrocka E. D., Nateshb R., van Rooyena J. M., Acharyab K. R. **Structure of angiotensin I-converting enzyme.** *Cell Mol Life Sci*2004; 61: 2677-86.
7. Roques P. B. **Insights into Peptide and Protein Function: A Convergent Approach**. *J Peptide Sci*2001; 7: 63-73.
8. Suda H., Aoyagi T., Takeuchi T., Umezawa H. **A Thermolysin inhibitor produced by actinomycetes: Phosphoramidon.** *J. Antibiotics* 1973; 26: 10, 621-623.
9. Weaver L. H., Kester W. R. and Mathews B. W. **A crystallographic study of the complex of phosphoramidon with termolysin. A model for the presumed catalytic transition state and for the binding of extended substrates.** *J. Mol. Biol. 1977, 114: 119-132.*
10. Benchetrit T., Fourni-Zaluski M.C. and Roques B.P. **Relationship between the inhibitory potencies of thiorphan and retrothiorphan enantiomers on thermolysin and neutral endopeptidase 24.11 and their interactions with the thermolysin active site by computer modelling.** *Biochemical and biophysical research communications* 1987, 147: 3, 1034-1040.
11. Holland D. R., Barclay P. L., Danilewicz J. C., Matthews B. W. and James K.. **Inhibition of Thermolysin and Neutral Endopeptidase 24.11 by a Novel Glutaramide Derivative: X-ray Structure Determination of the Thermolysin-Inhibitor Complex.** *Biochemistry 1994, 33, 5 1-56.*
12. Muta Y. and Inouye K. **Inhibitory Effects of Alcohols on Thermolysin Activity as Examined Using a Fluorescent Substrate.** *J. Biochem.* 2002, 132: 945-951.
13. Matthews B. W. **Structural Basis of the Action of Thermolysin and Related Zinc Peptidases**. *Acc. Chem. Res. 1988, 21, 333-340.*
14. Grobelny D., Goli U. B., Galardy R. E. **Binding Energetics of Phosphorus-Containing Inhibitors of Thermolysin.** *Biochem* 1989; 28: 4948-51.
15. Feder J., Brougham L. R., Wildi B. S. **Inhibition of Thermolysin by Dipeptides.** *Biochem* 1974; 13(6): 1186-9.
16. Kim J., Sieburth S. M. **A Silanediol Inhibitor of the Metalloprotease Thermolysin: Synthesis and Comparison with a Phosphinic Acid Inhibitor.** *J Org Chem* 2004; 69: 3008-14.

17. Yasukawa K., Kusano M. and Inouye K. **A new method for the extracellular production of recombinant thermolysin by co-expressing the mature sequence and pro-sequence in Escherichia coli.** *Protein Engineering, Design & Selection* 2007; 20 (8) 375–383.
18. MEROPS: the peptidase database. Disponible en http://merops.sanger.ac.uk/ .
19. Bohacek R, D.L.S., McMartin C, Priestle J, Gruetter M, **Three-Dimensional Models of ACE and NEP Inhibitors and Their Use in the Design of Potent Dual ACE/NEP Inhibitors** *J. Am. Chem. Soc.* 1996; 118 (35), 8231 -8249.
20. Tiraboschi, G., et al., **A three-dimensional construction of the active site (region 507- 749) of human neutral endopeptidase (EC.3.4.24.11).** *Protein Eng*, 1999; 12(2), 141-9.
21. Roques, B.P., **Zinc metallopeptidases: active site structure and design of selective and mixed inhibitors: new approaches in the search for analgesics and anti-hypertensives.** *Biochem Soc Trans*, 1993. **21** (3), 678-85.
22. Rang H.P., et al., **Pharmacology.** 5th ed. Vasoactive drugs. 2003: Churchil Livingstone. 296-298.
23. Yang, H.Y., Erdos E.G., and Levin Y., **A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin.** *Biochim Biophys Acta*, 1970. 214(2); 374-6.
24. Williams, T.A., P. Corvol, and F. Soubrier, **Identification of two active site residues in human angiotensin I-converting enzyme.** *J Biol Chem*, 1994. 269(47); 29430-4.
25. Soubrier, F., et al., **Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(24); 9386-90.
26. Waeber, B., J. Nussberger, and H.R. Brunner, **Angiotensin-converting-enzyme inhibition in arterial hypertension.** *Wien Med Wochenschr*, 1990. 140(1-2) 22-30.
27. Bland, N.D., et al., **Bioinformatic analysis of the neprilysin (M13) family of peptidases reveals complex evolutionary and functional relationships.** *BMC Evol Biol*, 2008. 8 (1); 16.
28. Moult, J., et al., **A large-scale experiment to assess protein structure prediction methods.** *Proteins*, 1995. 23(3); ii-v.
29. Holtje H.D., et al., **Molecular Modeling-Basic Principle and Appication.** 2nd ed. 2003: *Wiley-VCH.* 98,115.
30. DePriest S. A., Mayer D., Naylor Ch. B. and Marshall G. R. **3D-QSAR of Angiotensin-Converting Enzyme and Thermolysin Inhibitors: A Comparison of CoMFA Models Based on Deduced and Experimentally Determined Active Site Geometries.** *J. Am. Chem. SOC.* 1993,115, 5312-5384.
31. Marchand-Geneste N., Watson K. A., Alsberg B. K. and King R. D. **New Approach to Pharmacophore Mapping and QSAR Analysis Using Inductive Logic Programming. Application to Thermolysin Inhibitors and Glycogen Phosphorylase *b* Inhibitors.** *J. Med. Chem.* 2002**,** 45, 399-409.
32. Khan M. T., Fuskevag O. M., Sylte I. **Discovery of potent thermolysin inhibitors using structure based virtual screening and binding assays.** *J. Med. Chem.* 2009, 52(1); 48-61.

Trabajos relacionados

Bartlett P. A**.** and Otake A. **Fluoroalkenes as Peptide Isosteres: Ground State Analog Inhibitors of Thermolysin.** *J. Org. Chem.* 1995, 60, 3107-3111.

Kim J., Glekas A. and Sieburth S. McN. **Silanediol-Based Inhibitor of Thermolysin.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2002; 12, 3625–3627.

Lee K. J. and Kim D. H. **Inhibition of thermolysin with nitrone-bearing substrate analogs: A new type of thermolysin inhibitors.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1998; 8, 323-326.

T. Takeuchi, *et all*. **Inhibition of Thermolysin and Human _-Thrombin by Cobalt(III) Schi€ Base Complexes.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1999; 7, 815-819.

Jin Y. and Kim D. H. **D-Stereospecificity in the inhibition of thermolysin by N-acyl-N-hydroxy-c -amino acid esters.** *Tetrahedron: Asymmetry*, 1997; 8 (22) 3699-3702.

Park J. D. and Kim D. H. **Reversed Hydroxamate-Bearing Thermolysin Inhibitors Mimic a High-Energy Intermediate Along the Enzyme-Catalyzed Proteolytic Reaction Pathway.** *Bioorganic & MedicinalChemistry Letters*, 2003; 13, 3161–3166.

Bernard-Pierre Roques N. G.**. Thermolysin-lnhibitor Binding: Effect of the His23' + Ala Mutation on the Relative Affinities of Thiolate Versus Phosphoramidate lnhibitors— A Model Theoretical Investigation Incorporating a *Continuum* Reaction Field Hydration Model.** *Biopolymers*, 1997; 41, 145-164.

Gettins P. **Thermolysin-Inhibitor Complexes Examined by 31P and '13Cd NMR Spectroscopy.** *The journal of biological chemistry*, 1988; 263 (21), 10208-10211.

Shen J. and Wendoloski J. **Binding of phosphorus-containing inhibitors to thermolysin studied by the Poisson-Boltzmann method.** *Protein Sci.* 1995 4: 373-381.

Tronrud D. E., Holden H. M., Matthews B. W. **Structures of Two Thermolysin-Inhibitor Complexes that Differ by a Single Hydrogen Bond.** *Science*, 1987; 235 (4788) 571-574.

Holden H. M. and Matthews B. W. **The Binding of L-Valyl-L-tryptophan to Crystalline Thermolysin Illustrates the Mode of Interaction of a Product of Peptide Hydrolysis** *The Journal oj Biological Chemistry* 1988; 263 (7), 3256-3260.

Holmquist B.and Vallee B. L. **Metal Substitutions and Inhibition of Thermolysin: Spectra of the Cobalt Enzyme,** *The Journal of Biological Chemistry 1974; 249 (14) 4601-4607.*

Kreij A. *et all.* **The effect of changing the hydrophobic S_1' subsite of thermolysin-like proteases on substrate specificity.** *Eur. J. Biochem*, 2001; 268, 4985-4991.

Antonczak S., Monard G., Ruiz-López M. and Rivail J. L. **Insights in the Peptide Hydrolysis Mechanism by Thermolysin: A Theoretical QM/MM study**. *J. Mol. Model.* 2000, 6, 527 – 538.

Wasserman Z. R. and Hodge ***C.*** N. **Fitting an Inhibitor Into the Active Site of Thermolysin: A Molecular Dynamics Case Study.** *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 1996; 24, 227-237.

Mock W. L. and Aksamawati M. **Binding to thermolysin of phenolate-containing inhibitors necessitates a revised mechanism of catalysis.** *J. Biochem*, 1994; 302, 57-68.

Gaucher J. F. et all **Crystal Structures of R-Mercaptoacyldipeptides in the Thermolysin Active Site: Structural Parameters for a Zn Monodentation or Bidentation in Metalloendopeptidases**. *Biochemistry* 1999**,** *38,* 12569-12576.

Shen J. **A Theoretical Investigation of Tight-Binding Thermolysin Inhibitors.** *J. Med. Chem.* 1997**,** *40,* 2953-2958.

Murakami Y., Chiba K., Oda T., Hirata A. **Novel Kinetic Analysis of Enzymatic Dipeptide Synthesis: Effect of pH and Substrates on Thermolysin Catalysis.** *Biotechnology and Bioengineering, 2001; 74 (5)*

Turner, A. J., Isaac R. E., and Coates D. **The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function.** *BioEssays* 2001; 23, 261-269.

Kim S. J. *et all* **Origin of the Stereospecificity in Binding Hydroxamates of α- and β-Phenylalanine Methylamide to Thermolysin Revealed by the X-ray Crystallographic Study.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2003; 11, 2421–2426.

Baltora-Rosset S. *et all* **Micro-environment effect on the structure of synthetic substrates of thermolysin,** *Letters in Peptide Science, 1997; 4, 391–395.*

Selkti M. *et all*. **Interactions of a new a-aminophosphinic derivative inside the active site of TLN (thermolysin): a model for zinc-metalloendopeptidase inhibition.** *Acta Cryst. 2003; 59, 1200-1205.*

Kuzuya K. and Inouye K. **Effects of Cobalt-Substitution of the Active Zinc Ion in Thermolysin on Its Activity and Active-Site Microenvironment**, *J. Biochem. 2001; 130, 783-788.*

Pfuetzner R. A. and Chan W. W.-C. **Synergistic binding of hydrophobic probes and zinc ligands to thermolysin.** *Eur. J. Biochem.* 1993; 218, 523-528.

Mitchell J. K. *et all.* **Identifying common metalloprotease inhibitors by protein fold types using Fourier Transform Mass Spectrometry**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2007; 17, 6521–6524.*

Kunugi S., Hirohara H., and Ise N. **pH and Temperature Dependences of Thermolysin Catalysis. Catalytic Role of Zinc-Coordinated Water.** *Eur. J. Biochem. 1982; 124, 157-163.*

Kester W. R. and Matthews B. W. **Comparison of the Structures of Carboxypeptidase A and Thermolysin.** *The Journal of Biologycal Chemistry 1977; 252 (21)7704-7710.*

Garmer D. R., Gresh N. and Roques B.-P. **Modeling of Inhibitor–Metalloenzyme Interactions and Selectivity Using Molecular Mechanics Grounded in Quantum Chemistry.** *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics 1998; 31, 42–60.*

Benchetrit T., Fourni~-Zaluski M.C. and Roques B.P. **Relationship between the inhibitory potencies of thiorphan and retrothiorphan enantiomers on thermolysin and neutral endopeptidase 24.11 and their interactions with the thermolysin active site by computer modelling.** *Biochemical and biophysical research communications*, 1987; 147 (3) 1034-1040.

Sitios a visitar

- The MEROPS online database for peptidases and their inhibitors: M04.001
- MeSH *Thermolysin*
- http://en.wikipedia.org/wiki/Thermolysin
- http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphoramidon