



Politechnika Wroclawska

Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania

Wydział Chemiczny

Politechnika Wroclawska

mgr inż. Sylwia Modrzycka

ROZPRAWA DOKTORSKA

Opracowanie selektywnych markerów chemicznych
do badania aktywności wybranych proteaz serynowych
zaangażowanych w kaskadę krzepnięcia krwi

Promotor: prof. dr hab. Marcin Drąg

Promotor pomocniczy: dr inż. Paulina Kasperkiewicz-Wasilewska

Wrocław 2022



Rzeczpospolita
Polska



Fundacja na rzecz
Nauki Polskiej

Unia Europejska
Europejski Fundusz
Rozwoju Regionalnego



*Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi,
prof. dr hab. Marcinowi Drągowi za interesującą tematykę badawczą
oraz wszechstronną pomoc w trakcie realizacji rozprawy.*

*Dziękuję także mojej promotor pomocniczej,
dr inż. Paulinie Kasperkiewicz-Wasilewskiej za poświęcony czas,
liczne dyskusje naukowe oraz motywację do rozwiązywania problemów.*

*Dziękuję **mgr inż. Justynie Grzymskiej**
oraz **mgr inż. Mikołajowi Żmudzińskiemu**
za wspólnie spędzone lata podczas realizacji rozprawy doktorskiej.*

*Dziękuję również **Koleżankom i Kolegom z zespołu**
za stworzenie miłej atmosfery podczas pracy i za nawiązanie przyjaźni poza nią.*

Niniejszą rozprawę doktorską dedykuję Rodzicom i Kamilowi

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP TEORETYCZNY.....	10
1.1. Wprowadzenie	10
1.2. Proteazy serynowe	13
1.2.1. Mechanizm hydrolizy wiązania peptydowego	16
1.3. Wyznaczanie specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych.....	17
1.3.1. Chemiczne metody określania specyficzności substratowej proteaz	18
1.3.2. Biologiczne metody określania specyficzności substratowej proteaz	22
1.3.3. Proteomika	23
1.4. Markery chemiczne enzymów proteolitycznych	24
1.5. Kaskada krzepnięcia krwi.....	28
1.6. Aktywowane białko C, trombina i czynnik Xa – proteazy zależne od witaminy K.31	
1.6.1. Budowa i funkcje APC, trombiny i czynnika Xa w procesach fizjologicznych oraz patofizjologicznych.....	32
1.6.2. Profile specyficzności i substraty do badania aktywności APC, trombiny oraz czynnika Xa	35
1.6.3. Inhibitory aktywności APC, trombiny i czynnika Xa.....	39
1.7. Czynnik XIa – budowa, funkcje i udział w stanach patofizjologicznych.....	42
1.7.1. Preferencje katalityczne oraz substraty do badania aktywności czynnika XIa..	44
1.7.2. Inhibitory aktywności czynnika XIa.....	45
2. CEL PRACY	48
3. BADANIA WŁASNE	50
3.1. Określenie profilu specyficzności substratowej czynników krzepnięcia w pozycjach P4-P1.....	50
3.1.1. Zdefiniowana biblioteka do badania specyficzności substratowej kieszeni S1.50	
3.1.2. Biblioteka HyCoSuL do badania specyficzności w kieszeniach S4-S2	52
3.2. Projektowanie, synteza i analiza kinetyczna tetrapeptydowych substratów dla proteaz serynowych uczestniczących w ścieżce koagulacyjnej	59
3.2.1. Substraty dedykowane APC	61
3.2.2. Substraty dedykowane trombinie.....	63

3.2.3. Substraty dedykowane czynnikowi Xa	64
3.2.4. Substraty dedykowane czynnikowi XIa.....	66
3.3. Biotynyłowane markery chemiczne.....	69
3.3.1. Projektowanie biotynyłowanych markerów chemicznych	69
3.3.2. Synteza reaktywnej grupy wiążącej – Cbz-(di- <i>t</i> -Boc-Arg) ^P (OPh) ₂	71
3.3.3. Synteza fragmentów peptydowych zawierających linker i biotynę.....	73
3.3.4. Otrzymywanie biotynyłowanych markerów chemicznych.....	74
3.3.5. Badanie selektywności biotynyłowanych markerów chemicznych przy użyciu metody SDS-PAGE.....	77
3.4. Fluorescencyjne markery chemiczne i inhibitory	79
3.4.1. Projektowanie fluorescencyjnych markerów chemicznych i inhibitorów	79
3.4.2. Synteza fluorescencyjnych markerów chemicznych i inhibitorów.....	81
3.4.2. Badanie selektywności fluorescencyjnych markerów chemicznych przy użyciu metody SDS-PAGE.....	83
3.4.3. Jednoczesne znakowanie oraz inhibicja czynników krzepnięcia krwi przy użyciu fluorescencyjnych markerów chemicznych i inhibitorów	85
3.4.3. Badania kinetyczne fluorescencyjnych markerów chemicznych i inhibitorów	85
3.5. Znakowanie czynników krzepnięcia w ludzkim osoczu.....	87
3.5.1. Optymalizacja warunków detekcji czynników krzepnięcia w ludzkim osoczu.....	87
3.5.2. Jednoczesne znakowanie APC, trombiny i czynnika Xa w ludzkim osoczu.....	90
4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE	92
5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	97
5.1. Synteza znacznika fluorogenicznego Fmoc-ACC-OH	98
5.1.1. Synteza 3- <i>N</i> -(karboetoksy)aminofenolu	98
5.1.2. Synteza kwasu 7- <i>N</i> -(karboetoksy)aminokumaryno-4-octowego.....	99
5.1.3. Synteza kwasu 7-aminokumaryno-4-octowego	100
5.1.4. Synteza kwasu 7- <i>N</i> -(fluorenylometoksykarbonylo)aminokumaryno-4-octowego	100
5.2. Synteza zdefiniowanej biblioteki Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC oraz biblioteki kombinatorycznej HyCoSuL P1-Arg.....	101

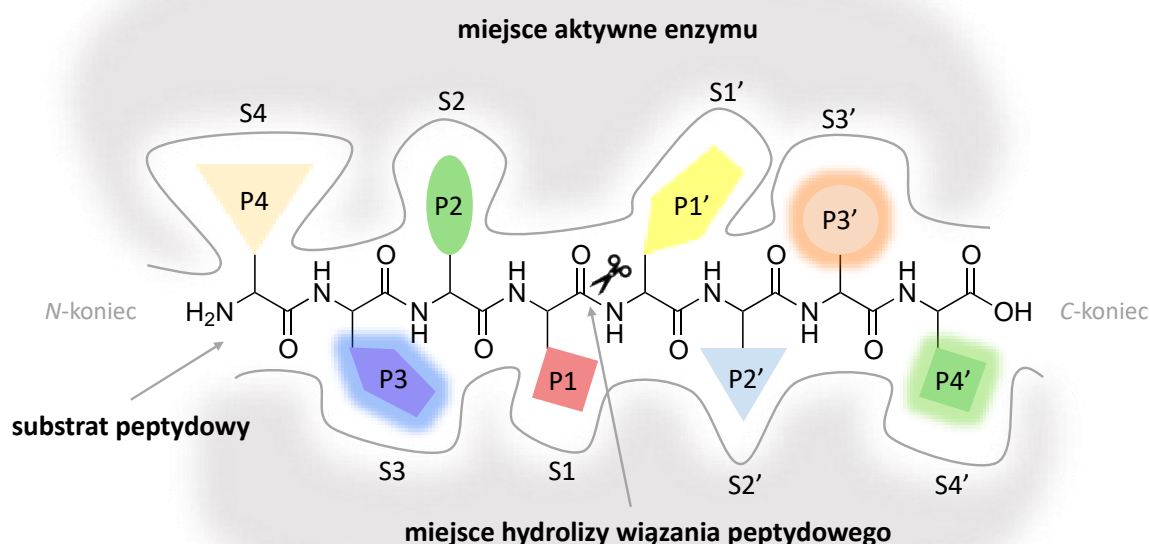
5.3. Badanie aktywności czynników krzepnięcia krwi wobec bibliotek substratów fluorogenicznych	101
5.4. Synteza zdefiniowanych substratów dla proteaz serynowych uczestniczących w ścieżce koagulacyjnej	103
5.5. Badanie aktywności biologicznej czynników krzepnięcia krwi względem zdefiniowanych substratów.....	107
5.6. Wyznaczenie parametrów kinetycznych (k_{kat} , K_M , k_{kat}/K_M) selektywnych substratów	108
5.7. Synteza grupy wiążącej Cbz-(di- <i>t</i> -Boc-Arg) ^P (OPh) ₂	108
5.7.1. Synteza <i>N</i> -etoksykarbonyloftalimidu	109
5.7.2. Synteza acetalu dietylowego aldehydu <i>N</i> -ftaloilo-4-aminomasłowego.....	109
5.7.3. Synteza aldehydu <i>N</i> -ftaloilo-4-aminomasłowego.....	110
5.7.4. Reakcja α -amidoalkilowania w kwasie octowym.....	110
5.7.5. Hydroliza grupy ftaloilowej.....	110
5.7.6. Synteza odczynnika guanidynującego	111
5.7.7. Reakcja guanidynowania	112
5.8. Synteza markerów chemicznych i inhibitorów	112
5.9. Analiza chromatograficzna czystości oraz HRMS otrzymanych fluorescencyjnych markerów chemicznych i inhibitorów	115
5.10. Badania kinetyczne markerów chemicznych i inhibitorów	123
5.11. Badanie markerów chemicznych i inhibitorów zsyntetyzowanych dla czynników krzepnięcia krwi przy użyciu metody SDS-PAGE.....	123
5.12. Znakowanie czynników krzepnięcia krwi w ludzkim osoczu	124
6. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	127
7. STRUKTURY AMINOKWASÓW UŻYTYCH W SYNTEZIE BIBLIOTEK.....	129
8. DOROBEK NAUKOWY	138
9. LITERATURA.....	140

1. WSTĘP TEORETYCZNY

1.1. Wprowadzenie

Białka są jednym z głównych składników budujących wszystkie żywe organizmy, a ich ilość i forma są ściśle kontrolowane na każdym etapie życia pojedynczej komórki. Źle pofalowane lub uszkodzone struktury są przekształcane w procesie hydrolizy w mniejsze produkty (oligopeptydy, dipeptydy, aminokwasy), które stanowią budulec do syntezy nowych biomolekuł. Proces ten jest istotny dla organizmu i ma bezpośredni wpływ na wzrost oraz przebudowę komórek i tkanek, a dodatkowo jest też korzystniejszy energetycznie w porównaniu do syntezy aminokwasów *de novo*. W organizmach żywych za degradację białek na mniejsze fragmenty poprzez hydrolizę wiązań peptydowych odpowiedzialne są enzymy proteolityczne (proteazy, peptydazy) [1, 2]. Oprócz usuwania niepotrzebnych protein, proteazy kontrolują także wiele ważnych procesów biologicznych takich jak kaskada krzepnięcia krwi, fibrynoliza, podziały komórkowe, apoptoza czy replikacja i transkrypcja DNA [2–5]. Część enzymów proteolitycznych syntetyzowanych jest w formie zymogenu, który aktywowany jest przez inne proteazy w czasie hydrolizy określonego fragmentu białka. Mechanizm ten dodatkowo wskazuje na istotną rolę tych enzymów w regulacji wielu procesów komórkowych. Dane dotyczące ludzkiego genomu wskazują, że proteazy stanowią ponad 2% wszystkich kodowanych białek. Jest to o tyle imponujące, gdyż odpowiada około 700 różnym enzymom występującym w ludzkim proteomie [6]. Ze względu na różnorodność pełnionych funkcji aktywność proteolityczna enzymów powinna być ściśle regulowana, za co odpowiedzialny jest zestaw endogennych inhibitorów. Zaburzenie równowagi między aktywnością proteaz, a ich inhibitorów prowadzi do wielu stanów patofizjologicznych, takich jak choroby nowotworowe, infekcje wirusowe, stany zapalne czy choroby neurodegeneracyjne i sercowo-naczyniowe [2, 7–10]. Tak znaczący udział proteaz w stanach chorobowych istotnie zwiększył zainteresowanie tą grupą enzymów, wymuszając tym samym poszukiwanie nowych związków chemicznych (substratów, inhibitorów, markerów chemicznych) umożliwiających badanie oraz modulowanie ich aktywności. Narzędzia takie mogą stanowić istotną pomoc w zrozumieniu funkcji i mechanizmu działania proteaz oraz dać podstawę do projektowania leków przeciw różnym chorobom [11, 12].

Jednym z głównych problemów utrudniających uzyskanie nowych narzędzi chemicznych jest brak selektywności względem docelowego enzymu proteolitycznego. Wynika to często z nakładającej się specyficzności substratowej danej grupy proteaz, określanej jako komplementarność łańcuchów bocznych substratu z architekturą centrum aktywnego danego enzymu [3, 13]. Skutkuje to tym, że proteazy rozpoznają podobne sekwencje peptydowe, a zaprojektowane markery i inhibitory dla jednej z nich kolejno znakują i hamują aktywność całej ich grupy [14]. Zjawisko to utrudnia prowadzenie badań w próbkach biologicznych, w których aktywnych jest wiele enzymów. Przykładem takich proteaz mogą być niektóre katepsyny, kaspazy, czynniki krzepnięcia krwi czy też enzymy deubikwitynujące (DUBs) [15–20]. W celu ujednoczenia systemu określenia specyficzności substratowej wszystkich proteaz w 1967 roku Schechter i Berger zaproponowali obowiązujące do tej pory nazewnictwo kieszeni wiążących w centrum aktywnym enzymu oraz odpowiadających im łańcuchów bocznych aminokwasów w substracie (Rysunek 1). Według tej konwencji aminokwasy na *N*-końcu substratu (P_n, ..., P₄, P₃, P₂, P₁) wiążą się do kieszeni S_n, ..., S₄, S₃, S₂, S₁, a te znajdujące się na *C*-końcu (P₁' , P₂' , P₃' , P₄' , ..., P_n) do kieszeni S₁' , S₂' , S₃' , S₄' , ..., S_n'. Hydroliza wiązania peptydowego odbywa się zawsze między pozycjami P₁ oraz P₁' [21].

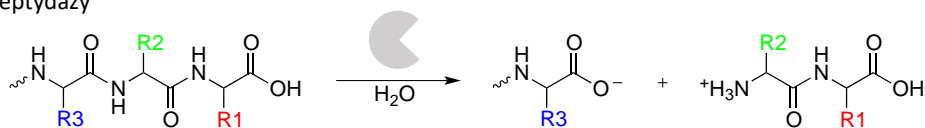


Rysunek 1. Schemat wiązania i hydrolizy substratu peptydowego w miejscu aktywnym proteazy.

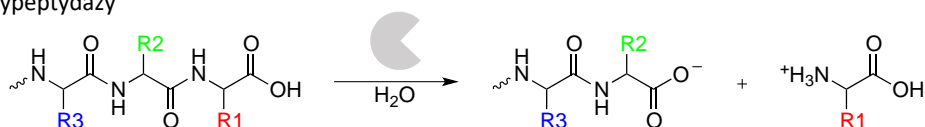
Proteazy stanowią bardzo dużą grupę enzymów i różnią się od siebie pod wieloma względami. Już w latach 30-tych XX wieku dokonano pierwszego ich podziału w zależności od miejsca występowania hydrolizy wiązania peptydowego. Enzymy działające na wiązania znajdujące się na końcach peptydów określono mianem egzopeptydaz, które podzielono kolejno na amino- i karboksypeptydazy hydrolizujące odpowiednio aminokwasy na N- i C- końcu substratów. Proteazy hydrolizujące wiązanie peptydowe wewnątrz łańcucha peptydowego nazwano endopeptydazami [22] (Rysunek 2). Kolejny podział uwzględniający typ mechanizmu hydrolizy substratu zaproponowano w 1960 roku i wyróżniono w nim cztery grupy: proteazy serynowe, cysteinowe, aspartylowe i metaloproteazy [23]. Po przedstawieniu struktury proteasomu w 1995 roku odkryto piąty rodzaj proteaz: proteazy treoninowe [24, 25], a w 2004 roku poznano szóstą grupę proteaz glutaminowych [26]. W przypadku proteaz serynowych, cysteinowych i treoninowych rolę nukleofila w procesie hydrolizy pełni grupa hydroksylowa (-OH) lub tiolowa (-SH) łańcucha bocznego aminokwasów znajdujących się w miejscu aktywnym enzymu. W proteazach aspartylowych, glutaminowych i metaloproteazach rolę nukleofila pełni cząsteczka wody, której aktywacja opiera się na wykorzystaniu kwasów karboksylowych łańcuchów bocznych aminokwasów centrum aktywnego (proteazy aspartylowe i glutaminowe) bądź atomów metali (metaloproteazy). Na przestrzeni ostatnich lat wyodrębniono kolejne dwie grupy enzymów proteolitycznych. Pierwsza z nich została zidentyfikowana przez Rawlingsa i Barretta w 2011 roku i nazwana liazami asparaginowymi [27]. Enzymy te nie są hydrolazami, a wiązanie peptydowe rozszczepiają wykorzystując reakcję eliminacji. Reszta asparaginy pełniąca funkcję nukleofila miejsca aktywnego bierze udział w autoprociesowaniu proteazy, co skutkuje uwolnieniem dwóch potomnym fragmentów enzymu [27, 28]. Ostatnią grupą enzymów są proteazy „ukryte” (ang. *cryptic proteases*) [29], których mechanizm proteolizy, struktura, funkcje fizjologiczne czy też naturalne substraty nie zostały jeszcze w pełni wyjaśnione i poznane.

Hydroliza wiązania peptydowego przez egzopeptydazy

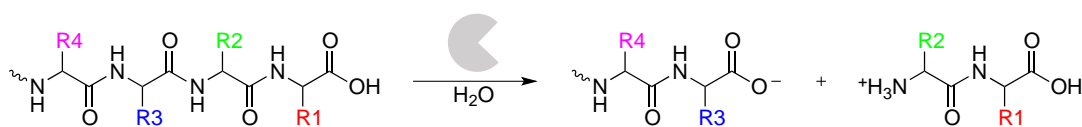
Aminopeptydazy



Karboksypeptydazy



Hydroliza wiązania peptydowego przez endopeptydazy



Rysunek 2. Mechanizm hydrolizy wiązania peptydowego przeprowadzany przez egzo- i endopeptydazy. Szary element to enzym proteolityczny, a „Rn” to dowolna reszta aminokwasowa w danej pozycji w łańcuchu peptydowym.

1.2. Proteazy serynowe

Proteazy serynowe są najliczniej występującymi enzymami proteolitycznymi stanowiącymi prawie jedną trzecią wszystkich zidentyfikowanych peptydaz. Enzymy te wykazują znaczne zróżnicowanie pod względem występowania i pełnionych przez nie funkcji. Według bazy danych MEROPS na grupę proteaz serynowych składa się 15 klanów, w których łącznie znajdują się aż 53 rodziny. Największą, a zarazem najlepiej poznaną grupę stanowią proteazy z klanu PA, które są szeroko rozpowszechnione wśród organizmów eukariotycznych [30, 31]. Ze względu na preferencje substratowe enzymy te podzielone zostały na trzy główne rodziny: proteazy o aktywności chymotrypsyno-, trypsyno- i elastazopodobnej, które rozpoznają i hydrolizują łańcuchy peptydowe po resztach aminokwasowych o różnym charakterze [21, 32, 33]. Przykłady proteaz należących do tych rodzin oraz ich preferencje co do aminokwasów w kieszeni S1 przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Preferencje substratowe oraz przykłady enzymów należących do trzech głównych rodzin proteaz serynowych.

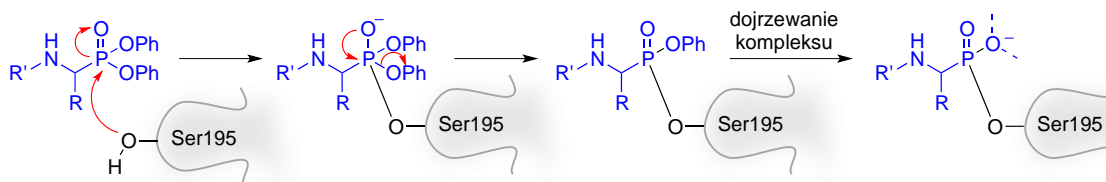
rodzina proteaz serynowych	charakter preferowanych aminokwasów w pozycji P1	przykłady rozpoznawanych aminokwasów	przykłady enzymów
chymotrypsynopodobne	duże, hydrofobowe	fenyloalanina, tryptofan, tyrozyna, leucyna	katepsyna G [34], chymaza [34], chymotrypsyna [35]
trypsynopodobne	dotąd dodatkowo naładowane	arginina, lizyna	granzym A [36], trypsyna [37], trombina [38], APC [39]
elastazopodobne	małe, hydrofobowe	alanina, walina	neutrofilowa elastaza [40], proteinaza 3 [41]

W ciągu ostatnich lat zaobserwowano wzrost zainteresowania badaniem proteaz serynowych. Wynika to głównie z faktu, iż enzymy te biorą udział w wielu procesach komórkowych przez co pełnią istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. Proteazy serynowe zaangażowane są w kaskadę krzepnięcia krwi (trombina, APC) [42], biorą udział w reorganizacji i przebudowie macierzy pozakomórkowej (kalikreiny, tryptaza) [43], w trawieniu (trzustkowa elastaza, trypsyna) [44], uczestniczą także w apoptozie (granzym A, granzym B) [45] oraz ochronie przed infekcjami wywołanymi przez drobnoustroje (katepsyna G, neutrofilowa elastaza) [40]. Zaburzenie aktywności tych enzymów jest częstym powodem występowania stanów chorobowych, a ich podwyższona lub obniżona aktywność może być sygnałem świadczącym o niekorzystnych zmianach. Dobrym przykładem jest kalikreina-6, której podwyższony poziom stwierdzono u pacjentów z nowotworem prostaty. Z kolei zwiększoną aktywność trombiny wykazano w patogenezie stwardnienia rozsianego [46] i w chorobie Alzheimera [47, 48].

Aby uniknąć występowania stanów patofizjologicznych, aktywność proteaz serynowych jest ściśle regulowana na kilka sposobów. W pierwszym z nich uczestniczą naturalnie wytwarzane inhibitory proteaz serynowych, tak zwane serpiny (ang. *serine protease inhibitors*, serpins) [49], które tworzą nieodwracalny kompleks z miejscem aktywnym enzymu zmieniając jego konformację i ostatecznie go inaktywując [50]. Kolejną grupą endogennych związków hamujących aktywność proteaz serynowych są przeciwciała. Blokują one aktywność enzymów używając jednego z dwóch mechanizmów. W pierwszym z nich przeciwciało oddziałuje z miejscem aktywnym proteazy blokując do niego dostęp i uniemożliwiając wiązanie się substratu. Drugi mechanizm zakłada wiązanie się przeciwciała w miejscu oddalonym od centrum aktywnego na zasadzie inhibicji allosterycznej, która wywołuje zmiany konformacyjne kieszeni wiążących blokując w ten

sposób dopasowanie i związanie się substratu [51]. Poza naturalnymi inhibitorami w ostatnich latach skupiono się także na poszukiwaniach syntetycznych odpowiedników. Podzielić je można na inhibitory niepeptydowe oraz peptydowe, czyli takie, które uzyskane zostały na podstawie struktury substratu. Inhibitory niepeptydowe otrzymuje się najczęściej poprzez badania przesiewowe dostępnej bazy związków, a następnie wprowadza się modyfikacje według zależności SAR struktura-aktywność (ang. *structure-activity relationship*) [52, 53]. Przykładem enzymów, dla których uzyskano inhibitory dzięki wykorzystaniu tego podejścia są proteazy HIV [54], czynnik Xa [55] oraz reniny [56]. Inhibitory peptydowe składają się z dwóch głównych elementów: fragmentu peptydowego projektowanego dla każdej proteazy indywidualnie oraz reaktywnej grupy wiążącej (ang. *warhead*), która sprawia, że inhibitor wiąże się w miejscu aktywnym enzymu. Szerokie badania nad specyficznością substratową proteaz pozwoliły na otrzymanie selektywnych inhibitorów oddziałujących tylko z docelową proteazą, eliminując przy tym reakcje krzyżowe z innymi białkami. Przykładem takiego podejścia jest otrzymanie peptydowych inhibitorów dla granzymu A [57], neutrofilowej serynowej proteiny 4 (NSP4) [58] oraz proteazy serynowej aktywującej czynnik VII (FSAP) [59].

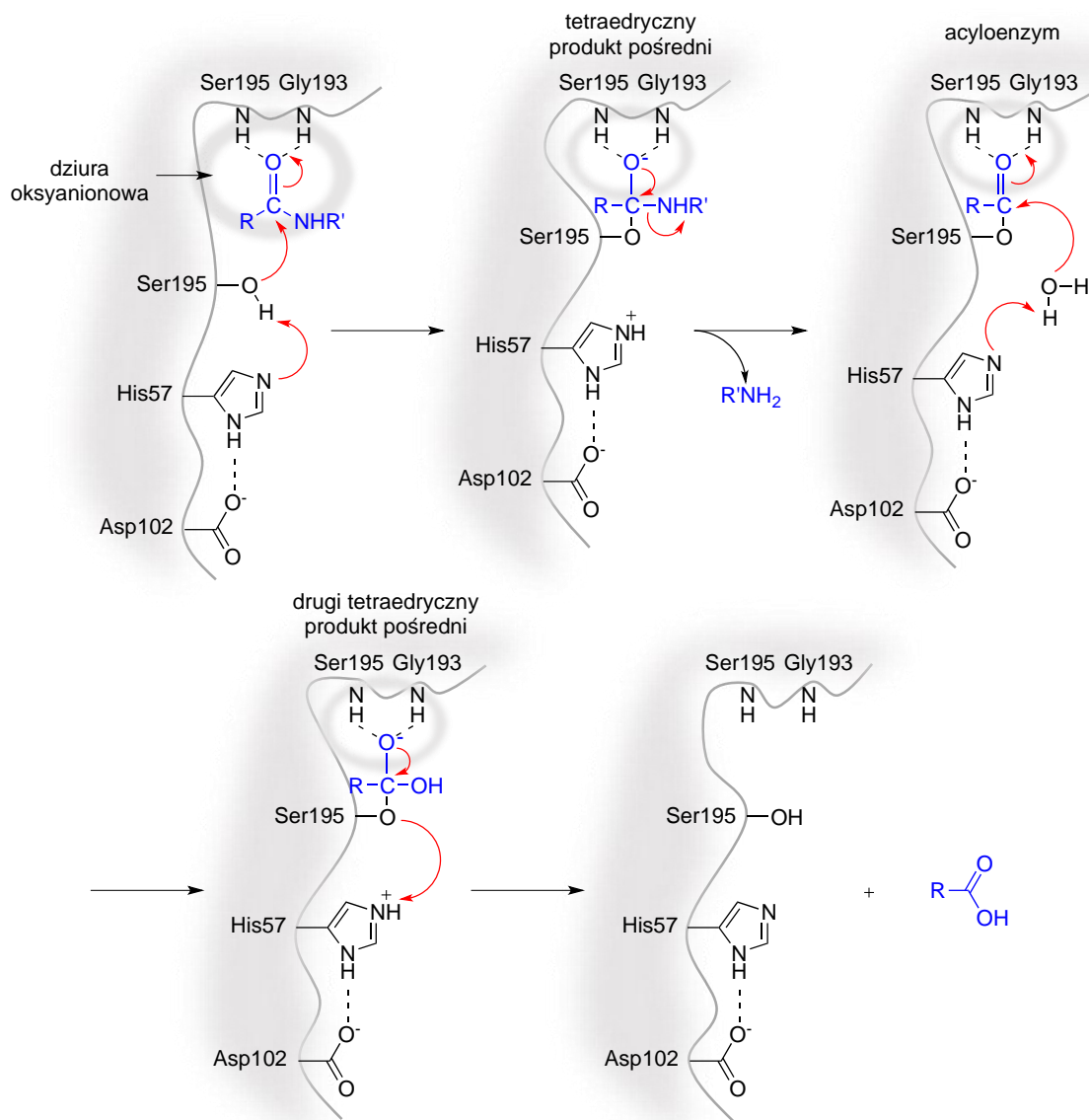
Jednymi z pierwszych zaprojektowanych związków hamujących działanie proteaz serynowych były chlorometyloketony, do których należy nieodwracalny inhibitor chymotrypsyny (tosyl-fenylalaninylchlorometyloketon) [60]. Kolejną grupą inhibitorów są związki heterocykliczne (nitrozoaminy, izobenzylfuranony, halometylokumaryny, izokumaryny), wśród których DCI (3,4-dichloroizokumaryna) jest najlepiej poznana i scharakteryzowana [60]. Ważną grupą inhibitorów są związki fosfonianowe, do których należą estry difenylowe kwasów α -aminoalkanofosfonowych cechujące się wysoką stabilnością, aktywnością oraz selektywnością względem proteaz serynowych. Atutem jest możliwość ich modyfikacji, m.in. przyłączenia fragmentu peptydowego, co dodatkowo poprawia ich parametry kinetyczne, dzięki zwiększeniu miejsc oddziaływania inhibitora z miejscem aktywnym enzymu [61, 62]. Mechanizm inhibicji proteazy serynowej przez ester difenylowy kwasu α -aminoalkanofosfonowego przedstawiono na Rysunku 3. W pierwszym etapie dochodzi do ataku grupy hydroksylowej Ser195 (numeracja chymotrypsyny) na atom fosforu, co skutkuje utworzeniem produktu przejściowego. Następnie jedna grupa estrowa zostaje odłączona, a w trakcie dojrzewania kompleksu związek traci także drugą grupę estrową. W powstałym monoestrze serynowym jeden atom tlenu jest stabilizowany w dziurze oksyanionowej, co nadaje otrzymanemu kompleksowi trwałość [60].



Rysunek 3. Mechanizm inhibicji proteazy serynowej przez ester difenylowy kwasu α -aminoalkanofosfonowego. Do zahamowania aktywności dochodzi poprzez utworzenie kowalencyjnego wiązania z udziałem grupy hydroksylowej reszty Ser195 (numeracja chymotrypsyny) [60].

1.2.1. Mechanizm hydrolizy wiązania peptydowego

Najczęściej do hydrolizy wiązania peptydowego proteazy serynowe wykorzystują znajdującą się w miejscu aktywnym tzw. triadę katalityczną składającą się z trzech reszt aminokwasowych: seryny, histydyny i kwasu asparaginowego (Ser-His-Asp). Mechanizm ten dla większości enzymów jest analogiczny do tego stosowanego przez chymotrypsynę, gdzie reszty aminokwasowe znajdujące się na pozycjach 195 (Ser), 57 (His) i 102 (Asp) biorą udział w wymianie ładunku prowadząc do hydrolizy stabilnego wiązania peptydowego. Grupa karboksylowa pochodząca od Asp102 warunkuje poprawną orientację reszty His57. Z kolei pierścień imidazolowy His57 wspomaga optymalizację ułożenia grupy hydroksylowej Ser195 (Rysunek 4). Hydroliza wiązania peptydowego rozpoczyna się, gdy reszty aminokwasowe wchodzące w skład substratu wiążą się z odpowiednimi kieszeniami miejsca aktywnego proteazy tworząc kompleks enzym-substrat [ES]. W kolejnym etapie dochodzi do ataku na karbonylowy węgiel substratu przez grupę hydroksylową Ser195 i utworzenie tetraedrycznego produktu pośredniego. Ładunek ujemny jest stabilizowany przez tzw. dziurę oksyanionową utworzoną przez reszty aminokwasowe głównego łańcucha białka (dodatkowo naładowane grupy -NH pochodzące od Ser195 oraz Gly193), które wiążą ujemnie naładowany tlen grupy karbonylowej. Funkcję zasady pełni tu dodatkowo naładowana reszta His57 stabilizowana przez wiązanie wodorowe utworzone z Asp102. Następnie dochodzi do hydrolizy wiązania peptydowego, gdzie His57 pełniąc rolę kwasu oddaje proton na powstałą grupę aminową. Skutkuje to rozpadem tetraedrycznego produktu pośredniego z utworzeniem acyloenzymu oraz uwolnieniem składnika aminowego. W kolejnym etapie udział bierze cząsteczka wody, która oddaje proton na resztę His57, a powstały w ten sposób nukleofil atakuje węgiel karbonylowy acyloenzymu. Skutkuje to utworzeniem drugiego tetraedrycznego produktu pośredniego, którego rozpad pozwala na uwolnienie składnika karboksylowego oraz regenerację cząsteczki enzymu [63, 64].



Rysunek 4. Mechanizm hydrolizy wiązania peptydowego przeprowadzany przez proteazy serynowe na przykładzie chymotrypsyny wykorzystującej triadę katalityczną Ser195-His57-Asp102 [64].

Poza klasycznym motywem Ser-His-Asp niektóre proteazy serynowe do hydrolizy wiązania peptydowego wykorzystują inny zestaw aminokwasów. Przykładowo sedolizyna stosuje triadę Ser-Glu-Asp, proteaza cytomegalowirusa Ser-His-His, a peptydaza E Ser-His-Asp [65, 66]. W późniejszych latach odkryto także motyw diady katalitycznej z udziałem Ser-His (proteaza romboidowa-1) lub Ser-Lys (peptydaza sygnałowa *E. coli*) [67, 68].

1.3. Wyznaczanie specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych

W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono na zdefiniowanie funkcji enzymów proteolitycznych uczestniczących w procesach fizjologicznych i patofizjologicznych.

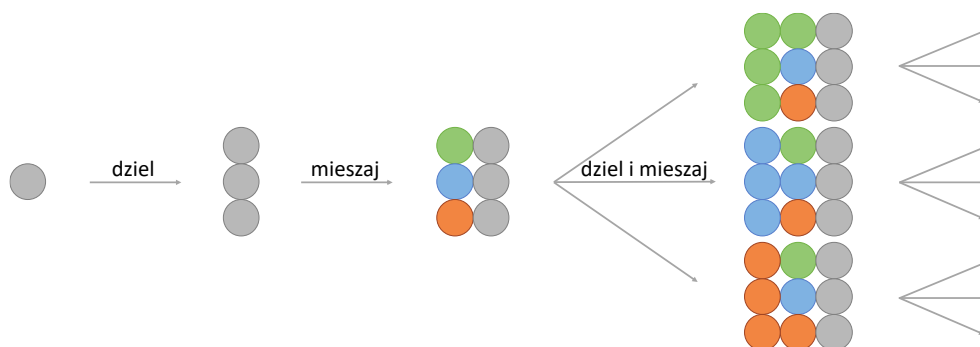
Poznanie specyficzności substratowej proteaz jest jednym z pierwszych etapów pozwalających na otrzymanie specyficznych i selektywnych narzędzi chemicznych umożliwiających określenie aktywności enzymów w układach biologicznych. Z medycznego punktu widzenia takie struktury mogą zostać następnie wykorzystane w projektowaniu skutecznych leków przeciwko wielu chorobom [78]. W niniejszym podrozdziale opisane zostały metody pozwalające na określenie preferencji substratowej enzymów w miejscu aktywnym po obu stronach (nieprimowanej i primowanej) hydrolizowanego wiązania peptydowego. Metody te podzielono na takie opierające się na syntezie chemicznej oraz te, w których wykorzystywane są systemy ekspresji biologicznej.

1.3.1. Chemiczne metody określania specyficzności substratowej proteaz

Podczas określania preferencji substratowej enzymów proteolitycznych stosuje się wiele różnych strategii i metod chemicznych. Większość z nich opiera się na skanowaniu bibliotek, w których skład wchodzi duża pula substratów peptydowych pozwalająca na sklasyfikowanie jak największej ilości oddziaływań. W celu otrzymania takich bibliotek wykorzystuje się metodę syntezy peptydów na podłożu stałym (ang. *solid phase peptide synthesis*, SPPS), gdzie do stałego nośnika (np. żywicy polimerowej) przyłączany jest pierwszy aminokwas na C-końcu wydłużanego peptydu, a następnie w cyklach reakcji łańcuch jest wydłużany o kolejne aminokwasy. Struktura takiej biblioteki różni się w zależności od badanej proteazy. Przykładowo biblioteka dla aminopeptydaz zawierać może jeden lub dwa aminokwasy z przyłączonym znacznikiem fluorogenicznym [69], z kolei dla katepsyny C substraty posiadać już muszą co najmniej dwa aminokwasy [70]. Najbardziej skomplikowane strukturalnie są jednak biblioteki dla endopeptydaz, gdzie każdy substrat składa się z kilku reszt aminokwasowych [71, 72]. Synteza i oczyszczanie tak dużej ilości pojedynczych substratów jest czasochłonna, dlatego stosuje się metody chemii kombinatorycznej pozwalające na otrzymanie wielu podobnych struktur w relatywnie krótkim czasie, bez konieczności oczyszczania. Do tej pory opracowano dwie szybkie i skuteczne metody umożliwiające syntezę takich bibliotek – technologię „dziel i mieszaj” (ang. *split and mix*) oraz technologię wykorzystującą mieszaniny izokinetyczne.

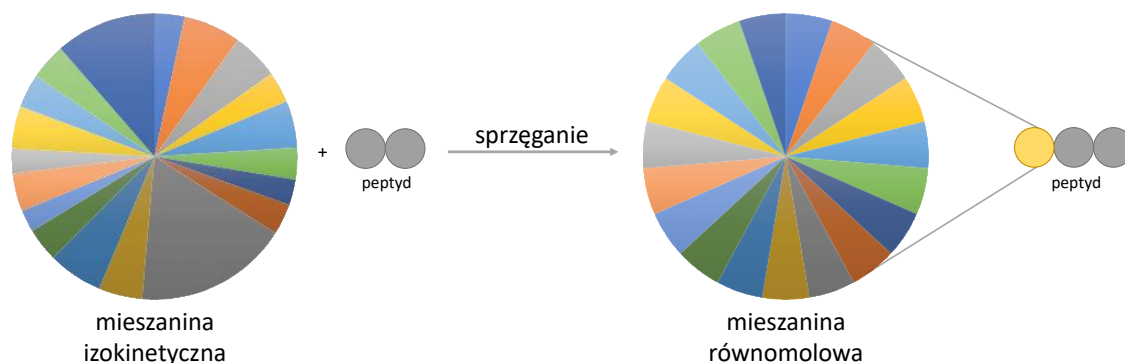
Metodę „dziel i mieszaj” opracowali w 1991 roku Furka i jego współpracownicy. Od tego czasu została ona wielokrotnie wykorzystana w badaniach specyficzności substratowej [73–75]. W metodzie tej wykorzystuje się naprzemienne cykle mieszania,

dzielenia i dołączania kolejnych pozycji aminokwasowych otrzymując dzięki temu wiele kombinacji związków. Synteza rozpoczyna się od podzielenia na równe części żywicy z przyłączonym aminokwasem, a do tych części dołączane są następnie różne reszty aminokwasowe. Żywica jest mieszana, znów dzielona na części, do których przyłączane są kolejne aminokwasy. Z każdym kolejnym cyklem ilość substratów rośnie geometrycznie pozwalając na uzyskanie biblioteki peptydów o różnych kombinacjach aminokwasów w sekwencji [73] (Rysunek 5).



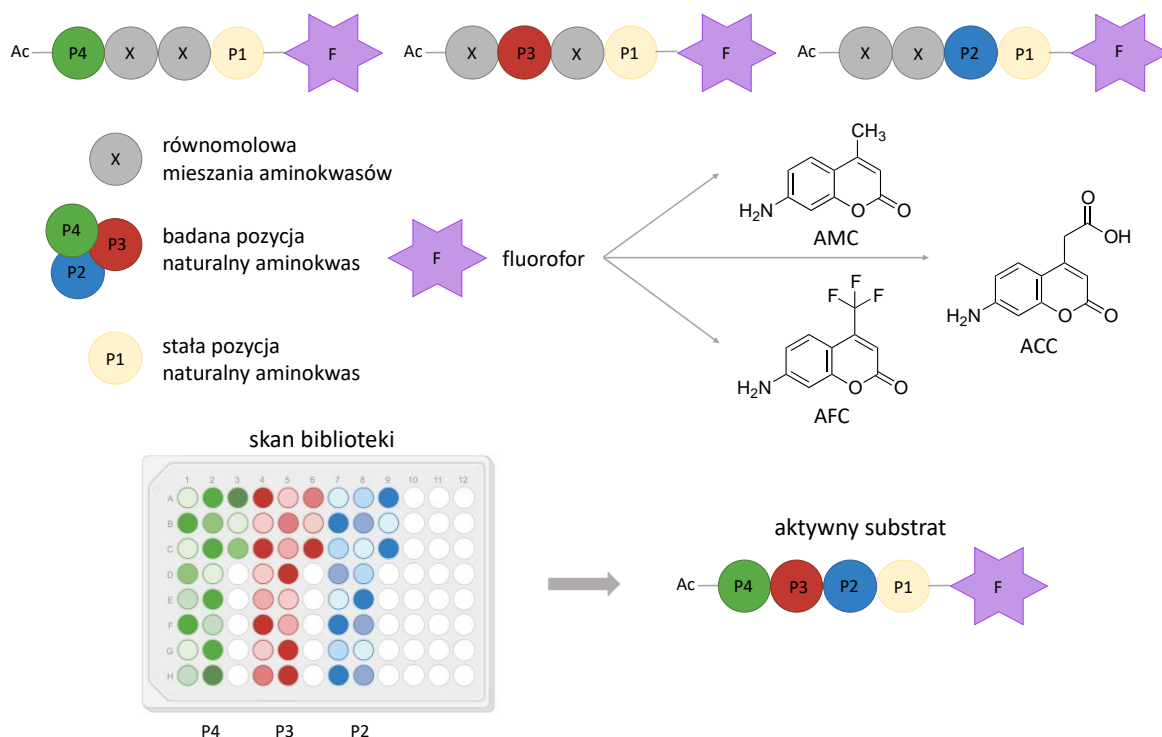
Rysunek 5. Schematyczne przedstawienie metody „dziel i mieszaj”.

Kolejna metoda pozwalająca na uzyskanie bibliotek służących do analizy przesiewowej peptydowych substratów opisana została w 1994 roku przez Ostresha i współpracowników [76]. Ideą tej technologii jest zastosowanie mieszaniny izokinetycznej 19 naturalnych aminokwasów (z pominięciem cysteiny i zastąpieniem metioniny norleucyną) w proporcjach uwzględniających wydajność reakcji sprzęgania. Pozwala to na otrzymanie po sprzęganiu równomolowej mieszaniny wszystkich aminokwasów (Rysunek 6). Po ustaleniu stopnia podstawienia każdego z aminokwasów określono ich ilość potrzebną do przygotowania mieszaniny izokinetycznej (% molowe): 3,4 – Fmoc-L-Ala-OH; 6,5 – Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH; 5,3 – Fmoc-L-Asn(Trt)-OH; 3,5 – Fmoc-L-Asp(*O*-*t*Bu)-OH; 3,6 – Fmoc-L-Glu(*O*-*t*Bu)-OH; 5,3 – Fmoc-L-Gln(Trt)-OH; 2,9 – Fmoc-Gly-OH; 3,5 – Fmoc-L-His(Trt)-OH; 17,4 – Fmoc-L-Ile-OH; 4,9 – Fmoc-L-Leu-OH; 6,2 – Fmoc-L-Lys(Boc)-OH; 3,8 – Fmoc-L-Nle-OH; 2,5 – Fmoc-L-Phe-OH; 4,3 – Fmoc-L-Pro-OH; 2,8 – Fmoc-L-Ser(*O*-*t*Bu)-OH; 4,8 – Fmoc-L-Thr(*O*-*t*Bu)-OH; 3,8 – Fmoc-L-Trp(Boc)-OH; 4,1 – Fmoc-L-Tyr(*O*-*t*Bu)-OH; 11,3 – Fmoc-L-Val-OH [76]. Zaletą mieszaniny izokinetycznej jest jej uniwersalność. Można ją stosować niezależnie od struktury syntetyzowanej biblioteki, a także w profilowaniu enzymów o różnych profilach specyficzności substratowej.



Rysunek 6. Schematyczne przedstawienie mieszaniny izokinetycznej i równomolowej.

Mieszaniny izokinetyczne są szeroko stosowane w metodzie PS-SCL (ang. *Positional Scanning Substrate Combinatorial Library*). W skład takiej biblioteki wchodzi trzy podbiblioteki umożliwiające badanie pozycji P4-P2. Reszta aminokwasowa w pozycji P1 wybierana jest na podstawie preferencji katalitycznych proteazy. W badanej pozycji (P4, P3 lub P2) znajduje się zdefiniowany naturalny aminokwas, a w pozostałych równomolowa mieszanina naturalnych aminokwasów [77] (Rysunek 7). Technologia ta opiera się na równoczesnym skanowaniu mieszaniny substratów. Z takiej mieszaniny, badany enzym hydrolizuje jedynie substraty komplementarne z jego miejscem aktywnym. Wyniki są następnie zbierane i przedstawiane w formie wykresu lub mapy cieplnej. Pomiar szybkości hydrolizy substratu umożliwia znacznik fluorogeniczny znajdujący się w pozycji P1', na C-końcu peptydu. Jego grupa aminowa tworzy wiązanie peptydowe z grupą karboksylową aminokwasu w pozycji P1. Przed hydrolizą fluorescencja nie jest detektowana lub jest bardzo słaba. Dopiero po hydrolizie wiązania peptydowego fluorofor zostaje uwolniony i wykazuje mierzalny metodami spektroskopowymi przyrost fluorescencji w czasie [78, 79]. Jednymi z najczęściej stosowanych w tej metodzie związków fluorogenicznych są pochodne kumaryny różniące się dołączonymi grupami w pozycji 4 (numeracja IUPAC). Przykładem jest AMC (7-amino-4-metylokumaryna) [77] i AFC (7-amino-4-trifluorometylokumaryna) [80]. Jednak dopiero ACC (7-amino-4-karbomilo-metylokumaryna) [81] wprowadzone w 2000 roku ułatwiło syntezę bibliotek i umożliwiło jej wykonanie metodą na podłożu stałym (Rysunek 7). Ta dwufunkcyjna zmodyfikowana pochodna kumaryny posiada grupę aminową, do której przyłączany jest pierwszy aminokwas peptydu, oraz dodatkową grupę karboksylową, dzięki której może ona zostać bezpośrednio przyłączona do żywicy [81, 82]. PS-SCL jest jedną z najczęściej stosowanych metod do określania preferencji substratowych enzymów [83]. Po raz pierwszy zastosowano ją w określeniu specyficzności substratowej kaspazy 1 [77], a następnie także przy wielu innych proteazach [20, 71, 84, 85].



Rysunek 7. Schemat bibliotek substratów fluorogenicznych używanych w metodzie PS-SCL wraz ze strukturami przykładowych fluoroforów oraz strategią określania specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych.

Głównym ograniczeniem metody PS-SCL jest brak możliwości uzyskania selektywnych struktur dla blisko spokrewnionych enzymów o nakładającej się specyficzności substratowej, tak jak miało to miejsce w przypadku metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMPs) [86] i kaspaz [87]. Naprzeciw tym ograniczeniom wychodzi technologia HyCoSuL (ang. *Hybrid Combinatorial Substrate Library*), która dzięki zastosowaniu w strukturze biblioteki naturalnych aminokwasów oraz szerokiej gamy ich nienaturalnych pochodnych stanowi rozszerzenie metody PS-SCL i umożliwia dokładniejsze zbadanie architektury kieszeni wiążących enzymu [88]. W skład takiej biblioteki wchodzi reszty aminokwasowe, których łańcuchy boczne mogą pokryć dużą część oddziaływań między kieszeniami miejsca aktywnego enzymu, a substratem. Główne grupy aminokwasów stosowane w technologii HyCoSuL to: aminokwasy zasadowe, aminokwasy kwaśne i ich estry, aminokwasy duże aromatyczne i małe alifatyczne, hydrofobowe i hydrofilowe, a także takie ze zdefiniowaną stereochemią (L lub D). Strategia HyCoSuL pozwala na znalezienie najbardziej preferowanych i selektywnych aminokwasów w danej pozycji oraz stanowi pierwszy krok w projektowaniu i syntezie substratów, inhibitorów i markerów chemicznych dla enzymów proteolitycznych [58, 89]. Przykładem wykorzystania bibliotek HyCoSuL jest opracowanie selektywnych substratów i markerów

chemicznych dla trzech podjednostek katalitycznych proteasomu [90] oraz neutrofilowej elastazy [91]. Technologia ta była także wykorzystana przy określaniu specyficzności substratowej kaspaz [92] i proteazy wirusa Zika (ZIKV NS2B-NS3^{pro}) [93].

Specyficzność substratową proteaz po primowanej stronie hydrolizowanego wiązania peptydowego najczęściej określa się wykorzystując wewnętrznie wygaszane substraty (ang. *internally quenched fluorescent substrates*, IQFs). Substraty typu IQF w swojej strukturze posiadają trzy główne elementy: grupę fluorogeniczną, która jest donorem fluorescencji, wygaszacz fluorescencji, który jest jej akceptorem (ang. *quencher*) oraz znajdującą się między nimi sekwencję peptydową dedykowaną enzymowi. W przypadku braku hydrolizy wiązania peptydowego widmo emisji fluoroforu nakłada się z widmem absorpcji wygaszacza prowadząc do wewnątrzcząsteczkowego transportu energii i wygaszenia fluorescencji. Po rozpoznaniu substratu i jego hydrolizie przez enzym, odległość pary donor/akceptor zwiększa się i następuje przyrost fluorescencji donora. Monitorowanie wzmożonej emisji sygnału daje podstawę do oceny aktywności badanego enzymu względem hydrolizowanej sekwencji, a co za tym idzie jego preferencji substratowych [94]. Do powszechnie wykorzystywanych par donor/akceptor należą: Abz-Tyr(NO₂) [95], Abz-EDDnp [96], EDANS-Dabcyl [94] oraz ACC-Lys(Dnp) [97]. Do tej pory przy użyciu bibliotek substratów typu IQF oznaczono specyficzność substratową enzymów proteolitycznych z grupy proteaz serynowych, a także cysteinowych, jak kaspazy [96], katepsyna G [98] czy też MALT1 [99].

1.3.2. Biologiczne metody określania specyficzności substratowej proteaz

Jedną z biologicznych metod umożliwiających określenie preferencji substratowych enzymów proteolitycznych są biblioteki fagowe, tzw. „*phage display*”. W metodzie tej do produkcji peptydów wykorzystuje się bakteriofagi, do genomu których wstawia się sekwencje nukleotydów kodujących naturalne aminokwasy [100]. Uzyskane w ten sposób peptydowe substraty poddaje się następnie reakcji z proteazą. Peptydy otrzymuje się w jednym z dwóch możliwych systemów: monoklonalnym lub poliklonalnym [100]. W systemie monoklonalnym ekspresja białek odbywa się w bakterii *E. coli*, do której wprowadzony zostaje fagmid. W systemie tym dochodzi do jednorazowej ekspresji substratów, co jest jego dużą wadą, ponieważ część sekwencji może zostać pominiętych dając niepełny obraz specyficzności substratowej enzymu [101]. Naprzeciw tym ograniczeniom wychodzi system poliklonalny, w którym otrzymane peptydy

immobilizowane są na podłożu stałym i poddawane działaniu proteazy. Dobrze rozpoznawane substraty po hydrolizie uwalniane są z podłoża, a następnie wprowadzane do *E. coli* celem otrzymania nowej biblioteki. Po kilku takich cyklach uzyskuje się bibliotekę najbardziej specyficznych substratów, a najlepsze z nich poddaje się klonowaniu. W ostatnim etapie określa się dokładną sekwencję wybranych substratów oraz miejsce hydrolizy wiązania peptydowego, co ostatecznie umożliwi określenie profilu specyficzności substratowej badanego enzymu [100]. W porównaniu do metod chemicznych, „*phage display*” pozwala na otrzymanie dłuższych sekwencji peptydowych, jednak nie ma możliwości wprowadzenia do nich nienaturalnych aminokwasów (jak w metodzie HyCoSuL) co ogranicza optymalizację struktury peptydów.

Kolejną metodą wykorzystującą układ biologiczny jest YESS (ang. *yeast endoplasmic reticulum sequestration screening*), która opracowana została w 2013 roku [102], a następnie udoskonalona dzięki zastosowaniu sekwencjonowania NGS (ang. *next generation sequencing*) [103]. W systemie tym stosowana jest biblioteka peptydowa znakowana epitopem hemaglutyniny (HA) wirusa grypy (sekwencja YPYDVPDYA) oraz znacznikiem FLAG (sekwencja DYKDDDDK). Taką bibliotekę dołącza się do białka Aga2 i kieruje się ją następnie do retikulum endoplazmatycznego drożdży. Dzięki interakcji Aga2 z białkiem Aga1, biblioteka transportowana jest na powierzchnię ściany komórkowej. W czasie transportu proteazy znajdujące się w siateczce śródplazmatycznej hydrolizują peptydy wchodzące w skład biblioteki, a ich C-końcowe fragmenty znakowane HA zostają odcięte. Drożdże znakowane są następnie przeciwciałami sprzężonymi z odpowiednimi fluoroforami: anty-FLAG (fluorofor PE) oraz anty-HA (fluorofor FITC). Wykorzystując cytometrię przepływową określa się stosunek PE do FITC, gdzie jego wysoka wartość świadczy o zajściu wielu reakcji hydrolizy w czasie transportu biblioteki na powierzchnię ściany komórkowej. Ostatecznie substraty peptydowe identyfikuje się dzięki sekwencjonowaniu genu peptydowego drożdży [103].

1.3.3. Proteomika

W porównaniu do szeroko stosowanych metod chemicznych i tych z wykorzystaniem układów biologicznych proteomika jest stosunkowo młodą nauką, której zastosowanie w celu określenia preferencji substratowych proteaz dopiero nabiera tempa. Proteomika zajmuje się badaniem struktury, funkcji oraz wzajemnych oddziaływań między białkami, co odróżnia ją od wcześniej omawianych metod. Metody chemiczne

i biologiczne koncentrują się głównie na tworzeniu bibliotek potencjalnych substratów oraz hydrolizie wiązania peptydowego w kontekście liniowych lub cyklicznych epitopów. W przeciwieństwie do nich proteomika pozwala na zbadanie architektury 3D oddziaływania substrat-enzym (struktura trzeciorzędowa), a analizie poddawane są substraty znajdujące się już w komórce [104, 105]. Jedną z metod używanych w proteomice jest analiza 2D-PAGE ekstraktów biologicznych, która ma na celu wykrycie fragmentów peptydowych powstałych po hydrolizie. Fragmenty te rozdzielane są dzięki różnicom w ich wielkości i ładunku, a następnie identyfikowane dzięki spektrometrii mas [83]. Rozszerzeniem tej metody są 2D-DIGE oraz PROTOMAP, które również wykorzystują technikę elektroforezy żelowej, ale powstały później w celu udoskonalenia metody 2D-PAGE [83]. Najczęściej stosowanymi metodami w proteomice są takie, które wykorzystują wolne *N*- i *C*-końce powstałe po hydrolizie wiązania peptydowego. W skład każdej analizy wchodzi dwa główne etapy: hydroliza proteomu przez endopeptydazę o znanej specyficzności substratowej (najczęściej trypsynę), a następnie hydroliza przez badany enzym proteolityczny. Analiza ta ma na celu zidentyfikowanie jak największej ilości zdarzeń wynikających z działania badanej proteazy, co ułatwione jest przez chemiczne znakowanie peptydów. Metody wykorzystujące taką strategię dzieli się w zależności od rodzaju i miejsca znakowania. Przykładem może być COFRADIC (ang. *Combined Fractional Diagonal Chromatography*), gdzie wolne grupy aminowe znakowane są za pomocą deuterioacetylacji. W metodzie tej do powstałych *N*-końców dołącza się kwas 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy (TNBS) zwiększający hydrofobowość i ułatwiający oczyszczanie na kolumnie [106]. Kolejnymi metodami są PICS (ang. *Proteomic Identification of protease Cleavage Sites*) i TAILS (ang. *Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates*) wykorzystujące kolejno znakowanie biotyną i izotopami. Otrzymane dzięki tym metodom fragmenty analizowane są następnie za pomocą spektrometrii mas [107, 108]. Proteomika zastosowana została w określaniu preferencji substratowych wielu enzymów proteolitycznych należących do proteaz serynowych, cysteinowych, aspartyłowych i metaloproteaz [109].

1.4. Markery chemiczne enzymów proteolitycznych

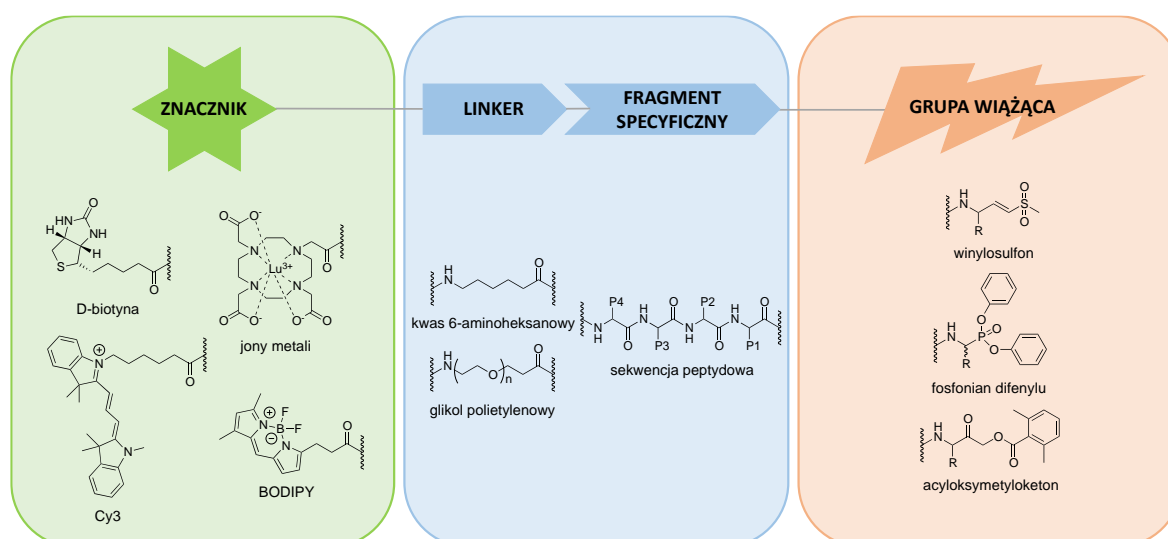
Zrozumienie procesów zachodzących w żywych komórkach stało się głównym celem wielu grup badawczych i doprowadziło do rozwinięcia takich metod jak np. analiza proteomiczna [110]. Ilościowa analiza proteaz w proteomie nie jest jednak wystarczająca do określenia ich aktywności proteolitycznej z kilku powodów. Po pierwsze poziom proteaz

w komórce jest ściśle kontrolowany przez ich ekspresję w postaci nieaktywnego zymogenu wymagającego aktywacji oraz przez endogenne inhibitory i sygnalizację komórkową [111]. Dodatkowo wpływ na aktywność mają także modyfikacje potranslacyjne takie jak acetylacja czy fosforylacja. Techniki wykorzystujące przeciwciała uniemożliwiają rozróżnienie aktywnej formy enzymu od nieaktywnej znakując wszystkie formy badanego białka obecne w próbce, co w kontekście badań nad aktywnością enzymów proteolitycznych może dawać niejednoznaczne wyniki. Naprzeciw tym ograniczeniom wychodzi nowy dział proteomiki – *activity-based protein profiling* (ABPP), który zajmuje się badaniem regulacji i analizą aktywności białek w złożonych proteomach. W metodzie tej do znakowania aktywności proteaz wykorzystuje się niskocząsteczkowe markery chemiczne (ang. *activity-based probes*, ABPs), które wiążą się jedynie do aktywnej formy enzymu. Markery takie mogą zostać użyte do znakowania proteaz w złożonych układach biologicznych jak np. lizaty komórkowe, komórki, tkanki, czy nawet całe organizmy [112, 113].

Klasyczne markery chemiczne pierwszej generacji w swojej strukturze zawierają trzy kluczowe elementy: reaktywną grupę wiążącą (ang. *warhead*) warunkującą kowalencyjne wiązanie się markera w centrum aktywnym enzymu, linker odpowiadający za rozpoznanie ABP oraz oddzielenie grupy wiążącej od trzeciego elementu – znacznika, który umożliwia z kolei detekcję docelowej proteazy (Rysunek 8) [113, 114]. Reaktywna grupa wiążąca ma za zadanie kowalencyjnie związać się z miejscem aktywnym enzymu i utworzyć z nim trwały kompleks. Poznanie mechanizmów hydrolizy wiązania peptydowego przez różne enzymy proteolityczne oraz ich klasyfikacja do rodzin katalitycznych umożliwiło zaprojektowanie dedykowanych selektywnych grup wiążących. Związki te pozwalają na wiązanie się tylko z grupą nukleofilową centrum aktywnego unikając przy tym reakcji krzyżowych z innymi nukleofilami białka i pozostałymi grupami proteaz [113]. W przypadku proteaz cysteinowych najczęściej wykorzystywanymi grupami wiążącymi są metyloketony, dla proteaz treoninowych winylosulfony, a dla proteaz serynowych estry difenyłowe kwasów α -aminoalkanofosfonowych [60].

Kolejny element ABP – linker oddziela grupę wiążącą od dużej cząsteczki znacznika minimalizując przy tym możliwość występowania zawady sterycznej i zmniejszenia powinowactwa do enzymu. Linker ułatwia także dopasowanie się markera do miejsca aktywnego proteazy, zwiększając jego dostępność, co dodatkowo ogranicza negatywny wpływ znacznika na selektywność ABP. Najprostszymi stosowanymi linkerami są

aminokwasy nie posiadające łańcuchów bocznych, takie jak β -alanina i glicyna. Najczęściej jako linker stosowane są jednak dłuższe związki alkilowe, np. kwas 6-aminoheksanowy lub polietery takie jak glikol polietylenowy, które poprawiają także hydrofilowość markerów. Poza podanymi związkami dodatkowo zastosować można także fragment reagujący w postaci krótkiej sekwencji peptydowej rozpoznawanej przez konkretny enzym, która mimikując substrat, zwiększa selektywność ABP [113, 114].



Rysunek 8. Schemat przedstawiający budowę niskocząsteczkowego markera chemicznego. ABP składa się z trzech głównych elementów: znacznika, linkera i grupy wiążącej, których przykłady wyszczególniono [112, 113].

Ostatnim elementem składającym się na strukturę markera chemicznego jest znacznik umożliwiający detekcję oraz oczyszczanie znakowanego białka. Jednymi z pierwszych używanych znaczników były radioizotopy (przykładowo ^{125}I), a białka wyznakowane nimi analizowane były przy użyciu jedno- i dwuwymiarowej elektroforezy, a następnie obrazowane metodą autoradiografii. Markery znakowane izotopami posłużyły w profilowaniu aktywności proteaz cysteinowych (katepsyn i kaspaz) oraz treoninowych (proteasomu) [113, 115–118]. Wadą takiego podejścia jest jednak ograniczona trwałość takich markerów wynikająca z szybkiego rozpadu izotopów oraz specjalne wymagania laboratoryjne zwiększające bezpieczeństwo pracy. Jednym z obecnie najczęściej stosowanych znaczników jest biotyna tworząca stabilny kompleks z awidyną lub streptawidyną, który umożliwia detekcję nawet bardzo małej ilości białka i jest odporny na różne warunki otoczenia, takie jak zmiana pH [113, 114]. Dodatkowo białka znakowane biotyną mogą zostać oczyszczone z mieszaniny na ziarnach agarozowych, co jest kolejną zaletą takiego podejścia [119, 120]. Głównym problemem związanym z wykorzystaniem

biotyny jest fakt, iż wyznakowanie enzymu biotynylowanym markerem chemicznym jest kilkusetapowe i czasochłonne. Sama biotyna nie ma właściwości fluorescencyjnych, a detekcja możliwa jest dopiero po połączeniu biotyny ze skoniugowaną z fluoroforem awidyną/streptawidyną [113]. Punktem przełomowym w projektowaniu markerów chemicznych okazało się zastosowanie fluorescencyjnych znaczników o różnych długościach fal wzbudzenia i emisji. Wykorzystanie tych różnic umożliwia bezpośrednią wizualizację kilku enzymów jednocześnie używając markerów znakowanych zestawem kilku fluoroforów. W porównaniu do użycia radioizotopów, znaczniki fluorescencyjne są bezpieczne i komercyjnie dostępne. Przykładem niedrogich znaczników fluorescencyjnych są fluoresceina i rodamina, które podatne są jednak na fotowysbielenie i nie są przepuszczalne przez błonę komórkową [121, 122]. Naprzeciw wszystkim tym ograniczeniom wychodzą barwniki cyjaninowe (Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7), BODIPY FL (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen) czy też seria znaczników Alexa Fluor®. Reprezentują one fotostabilną grupę fluoroforów o wysokiej wydajności kwantowej oraz wąskim widmie emisji. Przepuszczalne są przez błonę komórkową co umożliwia ich użycie w badaniach *in vivo*. Istotną ich wadą jest jednak wysoka cena [123]. Stabilne jony metali przejściowych (najczęściej lantanowce) są jednym z nowych rodzajów znaczników. W przeciwieństwie do wcześniej omawianych radioizotopów, jony te są chelatowane, dzięki czemu są stabilniejsze. Wykorzystując różnice w masie poszczególnych metali możliwa jest jednoczesna wizualizacja kilkunastu różnych parametrów w jednej komórce, którą wykonuje się za pomocą cytometrii masowej [124].

Markery chemiczne zastosować można na wiele sposobów. Do tej pory wykorzystywane zostały w badaniach biologicznych podczas określania funkcji oraz poziomu aktywności poszczególnych enzymów. Umożliwiają one także sprawdzenie selektywności nowych inhibitorów oraz mogą zostać użyte do określenia lokalizacji badanych enzymów za pomocą mikroskopii konfokalnej. Markery chemiczne stosowane są także w badaniach biochemicznych i strukturalnych centrum aktywnego enzymu [112]. Do tej pory ABPs z sukcesem wykorzystano podczas wykrywania zwiększonej aktywności enzymów w nowotworach [125]. Dzięki markerom chemicznym aktywność proteaz cysteinowych udało się powiązać z rozwojem malarii [126], a zaburzenia w poziomie katepsyny G i laktoferyny połączono z występowaniem stanów zapalnych [127].

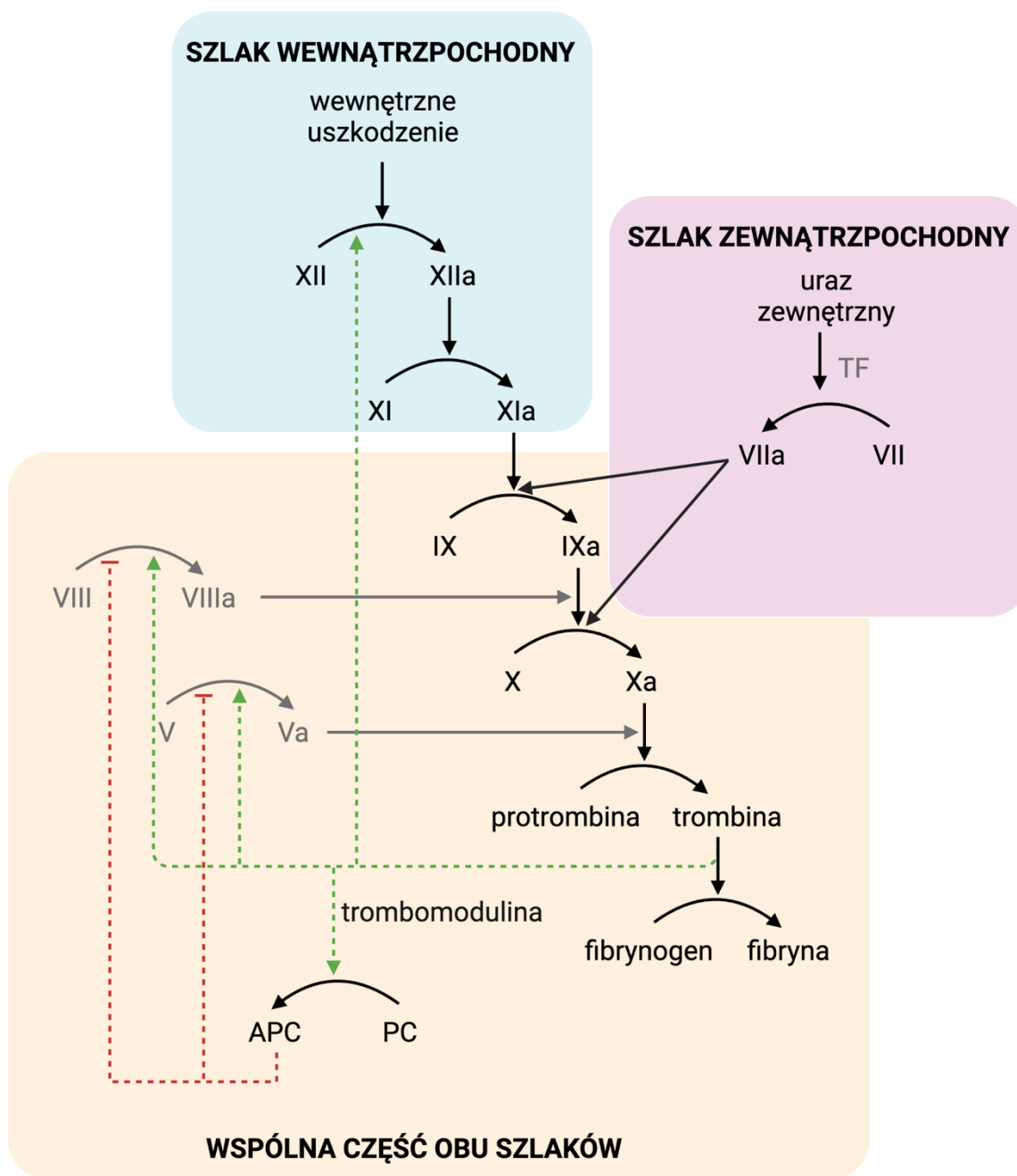
1.5. Kaskada krzepnięcia krwi

Kontrola szlaków sygnałowych to wyjątkowy mechanizm, który utrzymuje homeostazę, reguluje wiele procesów życiowych i przeciwdziała stanom patofizjologicznym. Ich działanie opiera się na synergistycznym występowaniu interakcji receptor-ligand oraz hydrolizie wiązań peptydowych przez proteazy. Jednym ze szlaków sygnałowych, w którym enzymy proteolityczne odgrywają wiodącą rolę, jest proces krzepnięcia krwi – kaskada zdarzeń związanych z aktywacją proteaz, w wyniku której powstaje enzym efektorowy – trombina (czynnik IIa). Kaskada krzepnięcia jest niezbędna do utrzymania skutecznej hemostazy, ponieważ rozpoczyna proces naprawy uszkodzonego śródbłonna i zapobiega samoistnemu krwawieniu. Ten skomplikowany proces obejmuje kilka reakcji, w których proteazy serynowe, krążące w krwiobiegu jako nieaktywne zymogeny, są aktywowane, a następnie działają jako katalizatory aktywując (poprzez hydrolizę odpowiedniego wiązania peptydowego) kolejne czynniki krzepnięcia [128]. Poza proteazami serynowymi (czynniki II, VII, IX, X, XI, XII i białko C) – kluczowymi uczestnikami tego procesu – występują również transglutaminaza (czynnik XIII), która tworzy usieciowaną fibrynę, oraz glikoproteiny (czynnik tkankowy (ang. *tissue factor*, TF), czynnik V, czynnik VIII), które pełnią funkcję kofaktorów i tworzą kompleks z odpowiednimi proteazami serynowymi [128]. Czynniki krzepnięcia oznaczają się zwykle cyframi rzymskimi. Po aktywacji do nazwy czynników dodawany jest przyrostek „a” (wyjątkiem jest aktywowane białko C (APC) oraz czynnik II i IIa, które określa się odpowiednio jako protrombina i trombina).

Kaskada krzepnięcia przebiega dwiema drogami, szlakiem zewnątrzpochodnym i wewnątrzpochodnym [129, 130]. Powstają one oddzielnie, ale zbiegają się następnie we wspólnym szlaku aktywacji fibrynogenu do fibryny i utworzenia nierozpuszczalnego skrzepu [131] (Rysunek 9). Faza inicjacji krzepnięcia krwi jest rozpoczynana przez szlak zewnątrzpochodny, wywołany urazem zewnętrznym z utratą krwi. Po uszkodzeniu naczynia krwionośnego TF znajdujący się na komórkach śródbłonna tworzy kompleks z aktywną formą czynnika VII (VIIa). Kompleks TF-VIIa indukuje aktywację czynnika X i zapoczątkowuje wspólny szlak, w którym czynnik Xa w kompleksie z czynnikiem Va (tzw. protrombinaza) katalizuje wytwarzanie trombiny, a następnie fibryny [128, 129]. Tymczasem szlak wewnątrzpochodny jest indukowany przez wewnętrzne uszkodzenie ściany naczynia. Kontakt krwi z ujemnie naładowanymi powierzchniami (np. kolagenem,

glikozaminoglikanami, sulfatydami) uszkodzonego śródbłonka powoduje przekształcenie czynnika XII w jego aktywną formę (XIIa). Czynniki XIIa aktywuje czynnik XI do XIa, który z kolei działa jako katalizator aktywacji czynnika IX do IXa. Aktywna forma czynnika IX łączy się z czynnikiem VIIIa, tworząc kompleks enzymatyczny (tzw. tenazę), który aktywuje czynnik X, prowadząc do powstania trombiny [128, 132]. Trombina, oprócz przekształcania rozpuszczalnego fibrynogenu w nierozpuszczalną fibrynę, może również wzmacniać szlak wewnętrzny poprzez aktywację czynnika XI. Ta pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego zwiększa produkcję trombiny sprawiając, że czynnik XII staje się mniej istotny [133, 134]. Trombina stymuluje także własne tworzenie przez proteolityczną aktywację czynników V i VIII [135]. Dodatkowo poza bezpośrednią generacją czynnika Xa, kompleks TF-VIIa może również pośrednio aktywować czynnik Xa. Droga ta przebiega przez aktywację czynnika IX, który następnie znów w obecności kofaktora VIIIa aktywuje czynnik X. Ścieżka ta jest dodatkowym elementem pozwalającym na otrzymanie trombiny, określanym jako faza wzmocnienia [133]. Trombina może nie tylko pobudzać krzepnięcie krwi, ale także mu zapobiegać. Kiedy stężenie trombiny we krwi wzrasta, aby zapobiec hiperkoagulacji, trombina łączy się z białkiem transmembranowym, trombomoduliną, i aktywuje białko C [136]. Aktywowane białko C (APC) jest silnym antykoagulantem, który pełni swoją funkcję poprzez proteolityczną inaktywację czynników Va i VIIIa. APC blokuje powstawanie dwóch głównych kompleksów (protrombinazy i tenazy), zmniejszając wytwarzanie trombiny, co skutecznie hamuje proces krzepnięcia [137].

Wszystkie proteazy biorące udział w tej skomplikowanej kaskadzie zdarzeń odgrywają istotną rolę w utrzymaniu równowagi między krzepnięciem, a krążeniem krwi. Wydaje się jednak, że hemostaza zależy głównie od aktywności trzech proteaz uczestniczących w końcowym etapie ścieżki koagulacyjnej: APC, trombiny i czynnika Xa. Zaburzenie naturalnie występujących w osoczu poziomów tych proteaz prowadzić może do poważnych schorzeń, takich jak hemofilia [138], zakrzepica [139–141] czy rozsiane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe [142]. W ostatnich latach również czynnik XIa zyskał wiele uwagi. Znajduje się on na wczesnym etapie kaskady krzepnięcia i w porównaniu do APC, trombiny i czynnika Xa ma ograniczone znaczenie w utrzymaniu prawidłowej hemostazy [143, 144]. Ostatnie badania kliniczne wskazują jednak, że czynnik XIa ma wpływ na występowanie chorób zakrzepowo-zatorowych [145]. Niniejszy rozdział poświęcony zostanie czterem proteazom serynowym uczestniczącym w kaskadzie krzepnięcia krwi – APC, trombinie, czynnikowi Xa oraz czynnikowi XIa.



Rysunek 9. Uproszczony schemat przedstawiający kaskadę krzepnięcia krwi. Krzepnięcie inicjowane jest przez zewnątrzpochodny kompleks TF-VIIa, który odpowiedzialny jest za wytwarzanie czynników IXa i Xa. Aktywny czynnik Xa wraz z swoim kofaktorem Va przekształca protrombinę w trombinę. Trombina uruchamia pętlę dodatniego sprzężenia zwrotnego, umożliwiając aktywację większej ilości czynników Va, VIIIa i XIa. Dodatkowo wewnątrzpochodny kompleks tenazy (IXa-VIIIa) aktywuje więcej czynnika X. Powstała w ten sposób trombina tworzy stabilny skrzep poprzez hydrolizę fibrynogenu do fibryny. Te procesy prokoagulacyjne są równoważone przez szlaki antykoagulacyjne, takie jak szlak białka C (PC). PC jest aktywowane przez trombinę związaną z trombomoduliną. Aktywowane białko C (APC) inaktywuje czynniki Va i VIIIa blokując dwa kompleksy: protrombinazę i tenazę. Kofaktory białkowe zaznaczono kolorem szarym. Zielone strzałki oznaczają reakcję aktywacji w pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego, a czerwone inhibicję.

1.6. Aktywowane białko C, trombina i czynnik Xa – proteazy zależne od witaminy K

Zainteresowanie kaskadą krzepnięcia krwi rozpoczęło się już w XIX wieku, chociaż dokładniejsze badanie procesu jej ewolucji trwa dopiero od około połowy XX wieku. W badaniach tych stosowane były różne strategie. W pierwszej z nich korzystając z metod biochemicznych poznawano mechanizmy krzepnięcia występujące u „prostszych” organizmów, a otrzymane wyniki porównywano z wiedzą o kaskadzie krzepnięcia człowieka. W kolejnym podejściu oczyszczano każdy z czynników, określano jego właściwości chemiczne i szukano odpowiednika u człowieka [146]. Trzecia strategia opierała się na metodach genetyki molekularnej i wykorzystaniu klonowania i sekwencjonowania DNA. Tylko na podstawie tej metody udało się zsekwencjonować genomy kilkunastu organizmów (przykładowo danio pręgowanego (*Danio rerio*), zielonej jaszczurki amerykańskiej (*Anolis carolinensis*), czy też dziobaka (*Ornithorhynchus anatinus*)) i odnaleźć około 20 różnych genów będących ich odpowiednikami w układzie hemostazy człowieka [147–150]. W ostatnim głównym podejściu zastosowano metody bioinformatyczne, które umożliwiły rekonstrukcję ewolucji układu krzepnięcia *in silico*, co znacząco ograniczyło dotychczasowe koszty badań *in vitro* i *ex vivo* [146]. Po ustaleniu sekwencji aminokwasowej niektórych czynników krzepnięcia zauważono występowanie między nimi podobieństw. Część z nich posiadała w swojej strukturze podobne domeny, a niektóre czynniki nawet taką samą kolejność ich występowania. Za przyczynę tej homologii uznano duplikację genów już u przodków współczesnych organizmów [146]. Przykładem takich zbliżonych do siebie czynników mogą być aktywowane białko C (APC), trombina i czynnik Xa. Czynniki te są trypsynopodobnymi proteazami serynowymi zależnymi od witaminy K, które mają kluczowe znaczenie w procesie krzepnięcia krwi. Biorą one udział w końcowym etapie kaskady krzepnięcia krwi i uważane są za jedne z najistotniejszych czynników, których zaburzenie aktywności prowadzić może do występowania poważnych schorzeń. Dodatkowo enzymy te poza znaczącą homologią strukturalną, charakteryzują się podobną specyficnością substratową, co utrudnia ich detekcję w próbkach biologicznych [15, 16, 82, 151]. W rozdziale tym przedstawione zostaną informacje dotyczące budowy, funkcji, preferencji substratowych i dotychczas uzyskanych struktur dla APC, trombiny i czynnika Xa.

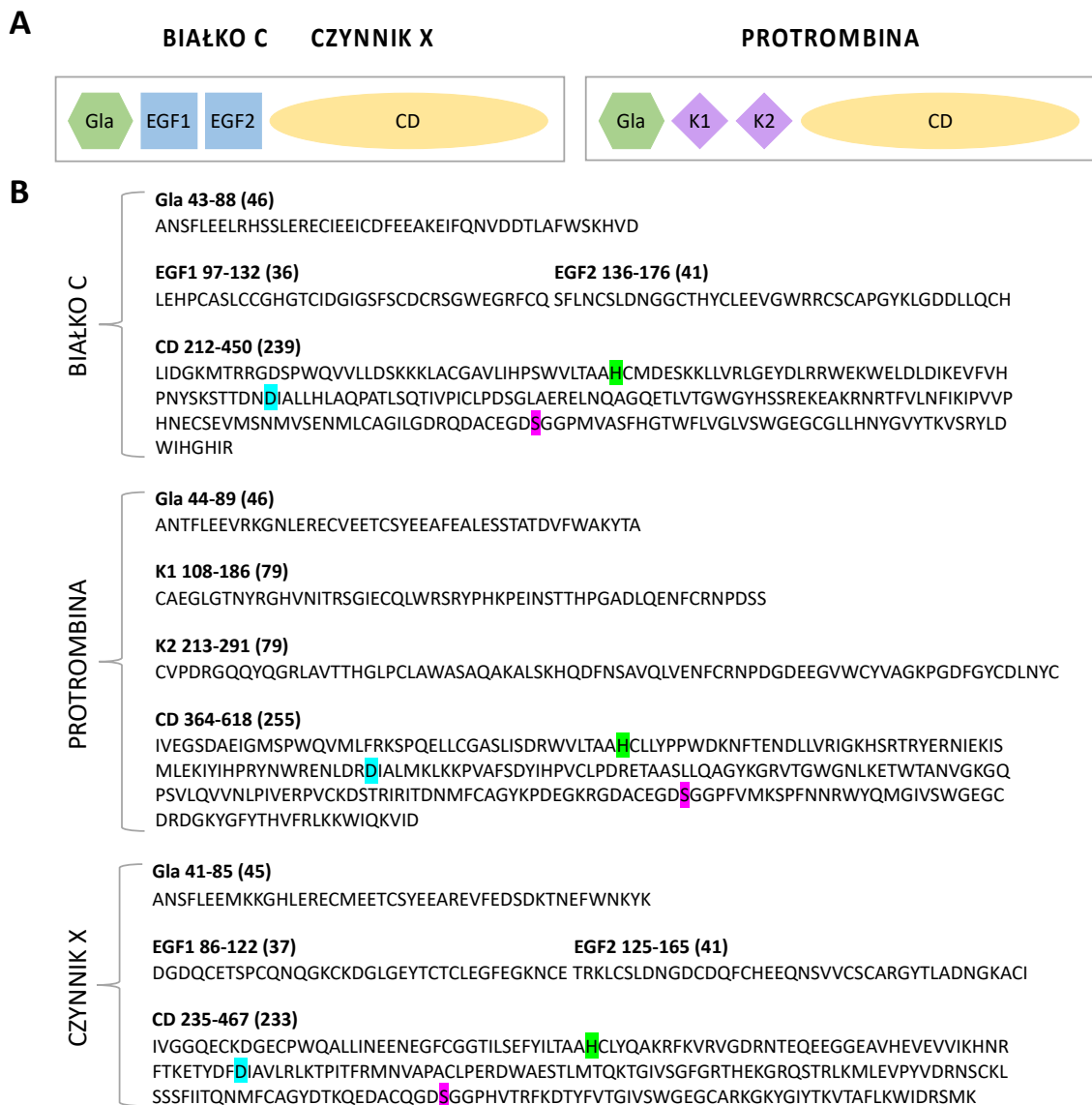
1.6.1. Budowa i funkcje APC, trombiny i czynnika Xa w procesach fizjologicznych oraz patofizjologicznych

Białko C (PC) (EC: 3.4.21.69) znajduje się w osoczu w formie nieaktywnego zymogenu o masie 62 kDa. Ma mozaikową strukturę zawierającą *N*-końcową domenę kwasu γ -karboksylglutaminowego (Gla). Do prawidłowego funkcjonowania proteazy posiadającej taką domenę niezbędna jest witamina K pełniąca rolę kofaktora γ -karboksylazy, enzymu odpowiadającego za modyfikację kwasu glutaminowego do γ -glutaminianu [152]. W skład białka C wchodzi także dwie domeny czynnika wzrostu naskórka (EGF) (ang. *epidermal growth factor (EGF)-like domains*) oraz peptyd aktywujący. Na końcu znajduje się trypsynopodobna domena proteazy serynowej (ang. *catalytic domain*, CD) zawierająca triadę katalityczną zbudowaną z reszt His211, Asp257 i Ser360. Białko C jest aktywowane poprzez oddziaływanie z trombiną w kompleksie z trombomoduliną (TM). Trombina związana z TM usuwa peptyd aktywujący PC poprzez hydrolizę wiązania peptydowego przy Arg169, co prowadzi do powstania aktywowanego białka C (APC) [151, 153]. Powstałe w pełni aktywne APC krąży jako heterodimer składający się z łańcucha ciężkiego o masie 41 kDa i łańcucha lekkiego o masie 21 kDa, które są połączone mostkiem disiarczkowym [151].

Protrombina (EC: 3.4.21.5) to nieaktywna forma trombiny o masie 72 kD. Cechą wspólną w strukturze proteaz zależnych od witaminy K jest znajdująca się na *N*-końcu domena Gla, która występuje także u protrombiny. Kolejne są dwie domeny kringlowe oraz największa zlokalizowana na *C*-końcu domena odpowiadająca za aktywność proteolityczną. Podczas aktywacji kaskady krzepnięcia protrombina jest przekształcana w trombinę przez protrombinazę – kompleks składający się z proteazy serynowej Xa i jej kofaktora czynnika Va. W reakcji tej czynnik Xa początkowo hydrolizuje wiązanie peptydowe przy Arg320, tworząc mezotrombinę. Ten produkt pośredni ulega następnie kolejnej hydrolizie przy Arg271 [154, 155]. Powstała w ten sposób aktywna trombina ma masę 36 kDa oraz dostępną triadę katalityczną składającą się z His43, Asp99 i Ser205 [155].

Czynnik X (EC: 3.4.21.6) to kolejna proteaza zależna od witaminy K krążąca w osoczu jako zymogen. Składa się ona z łańcucha lekkiego (16,5 kDa) oraz ciężkiego (42 kDa) połączonych ze sobą mostkiem disiarczkowym. Łańcuch lekki zawiera domenę Gla oraz dwie domeny czynnika wzrostu naskórka (EGF). Łańcuch ciężki czynnika X zawiera peptyd aktywujący oraz trypsynopodobną domenę proteazy serynowej,

która zawiera triadę katalityczną złożoną z His236, Asp282 i Ser379. Budowa domenowa czynnika X bezpośrednio odpowiada tej omawianej wcześniej dla białka C, co dodatkowo podkreśla pokrewieństwo tych dwóch enzymów. Czynniki X znajduje się w samym centrum kaskady krzepnięcia krwi i może zostać aktywowany na drodze zewnątrzpochodnej przez kompleks TF-VIIa, jak i wewnątrzpochodnej przez kompleks VIIIa-IXa. Aktywacja proteolityczna czynnika X następuje przez hydrolizę wiązania peptydowego Arg194-Ile195 [156].



Rysunek 10. Budowa domenowa czynników krzepnięcia – białka C, protrombiny oraz czynnika X. (A) Uproszczony schemat, gdzie Gla oznacza domenę kwasu γ -karboksylglutaminowego, EGF domenę czynnika wzrostu naskórka, K domenę kringlową, a CD domenę katalityczną. (B) Sekwencje aminokwasów kodujących poszczególne domeny czynników krzepnięcia wraz z resztami, które się na nie składają i ich liczbą w nawiasie. Dla każdego enzymu zaznaczono triadę katalityczną (His, Asp, Ser). Opracowanie własne na podstawie baz danych UniProt.

APC jako centralny enzym szlaku antykoagulacyjnego, pełni swoją funkcję biologiczną poprzez blokowanie czynników Va i VIIIa, zmniejszając wytwarzanie trombiny i czynnika Xa, co skutecznie osłabia proces krzepnięcia krwi. Wraz z aktywnością przeciwzakrzepową, APC pełni wiele ważnych funkcji cytoprotekcyjnych. APC chroni przepuszczalność ścian naczyń krwionośnych, modulację ekspresję genów oraz ma działanie antyapoptotyczne i przeciwzapalne [39, 157]. Prawidłowa aktywność APC jest niezbędna do utrzymania hemostazy. Zmniejszone stężenie krążącego APC jest związane z 10-krotnym wzrostem ryzyka wystąpienia u pacjentów wczesnej i nawracającej zakrzepicy żyłnej [39, 141, 158]. Obniżona aktywność APC jest też czynnikiem mogącym doprowadzić do takich powikłań jak noworodkowa plamica piorunująca, zagrażający życiu stan charakteryzujący się zakrzepicą mikronaczyniową [159]. Zaburzenia aktywności APC powiązane także z występowaniem hemofilii [157] oraz zespołu rozsianego wykrzepianie wewnątrznacyniowego (ang. *disseminated intravascular coagulation*, DIC) [158]. Z drugiej strony efekty cytoprotekcyjne APC skorelowano z poinfekcyjnym udarem niedokrwiennym [39, 141] oraz zachorowalnością i śmiertelnością w sepsie [160].

Poza kaskadą krzepnięcia trombina bierze udział również w stanach zapalnych oraz odgrywa istotną rolę we włóknieniu, angiogenezie i infekcjach wirusowych [161]. Tak jak w przypadku APC zaburzenie aktywności trombiny zauważono przy hemofilii [138], zakrzepicy [140] i zespole rozsianego wykrzepianie wewnątrznacyniowego [142]. Aktywność trombiny przyczynia się do udaru mózgu i jest uważana za naturalny cel jego prewencji [162]. Ponadto zwiększone wytwarzanie trombiny wykazano w patogenezie stwardnienia rozsianego [46] i choroby Alzheimera [47, 48]. Aktywność trombiny jest również związana z progresją nowotworów [163], a ostatnie badania wskazują na możliwość zastosowania jej inhibitorów w leczeniu pacjentów z COVID-19 [161].

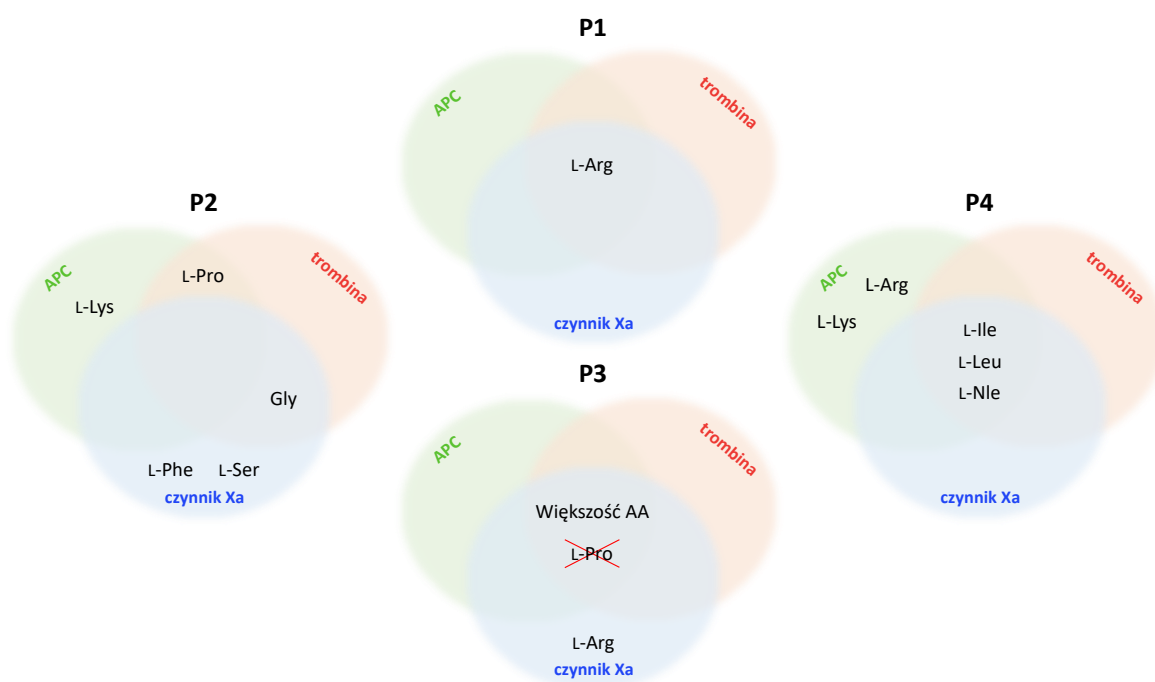
Czynnik Xa jest jedną z ważniejszych proteaz zaangażowanych w kaskadę krzepnięcia krwi, ponieważ odpowiada on za aktywację protrombiny do trombiny. Ze względu na swoją istotną rolę jego poziom jest ściśle kontrolowany, a aktywacja zapewniona dwiema możliwymi drogami – wewnątrz- i zewnątrzpochodną. Właśnie ze względu na to czynnik X stał się ciekawym celem terapeutycznym. Poza trombiną jest on kolejnym enzymem, który ma tak znaczący (choć nie bezpośredni) wpływ na występowanie chorób zakrzepowo-zatorowych [164]. Niedobór czynnika X jest jednym z najrzadszych dziedzicznych zaburzeń krzepnięcia. Częstość jego występowania wynosi około 1:1000000

w populacji ogólnej. U osób z łagodnym niedoborem czynnika X łatwo dochodzi do powstawania siniaków, krwawień z nosa lub ust, a także po urazach i zabiegach chirurgicznych. Objawy u pacjentów z ciężkim niedoborem obejmują krwawienia z pępowiny, ze stawów, krwawienia śródmięśniowe oraz wysokie ryzyko krwotoku śródczaszkowego w pierwszych tygodniach życia. W przeciwieństwie do hemofilii typu A (niedobór czynnika VIII) i B (niedobór czynnika IX) niedobór czynnika X dotyka zarówno mężczyzn jak i kobiet w równym stopniu [165, 166].

1.6.2. Profile specyficzności i substraty do badania aktywności APC, trombiny oraz czynnika Xa

Badania nad specyficznością substratową APC, trombiny i czynnika Xa rozpoczęły się już we wczesnych lat 80-tych XX wieku. Preferencje substratowe tych proteaz próbowano określić na podstawie motywu rozpoznawanego w ich substratach fizjologicznych [71, 82, 167, 168], następnie wykorzystując chromogeniczne substraty peptydowe [169, 170] oraz substraty typu IQF (ang. *internally quenched fluorescent substrates*) [171–173]. Dodatkowo specyficzność substratową określano przy użyciu takich metod jak PS-SCL [71] i „phage display” [170]. Badania te wykazały, że wszystkie trzy trypsynopodobne proteazy oddziałują prawie wyłącznie z dodatnio naładowaną arginina w pozycji P1. Jest to zgodne z wcześniej uzyskanymi strukturami krystalicznymi tych enzymów [151, 174], w których kieszeń S1 jest uważana za hydrofobową, a znajdująca się w niej reszta Asp służy jako miejsce rozpoznania dla zasadowego łańcucha bocznego. Kieszeń S1 we wszystkich trzech przypadkach jest także szeroka, głęboka i wysoce konserwatywna, co sprawia, że zaprojektowanie selektywnych sekwencji peptydowych dla APC, trombiny i czynnika Xa może stanowić wyzwanie. Kieszenie S2 tych trzech enzymów uczestniczących w kaskadzie krzepnięcia wykazują wysoki poziomem specyficzności substratowej. APC rozpoznaje w tej pozycji L-Pro, ale także większe łańcuchy boczne tak jak w przypadku L-Lys [157, 175, 176]. Kieszeń S2 trombiny utworzona przez Tyr60A, Trp60D, His57 i Leu99 jest mała i hydrofobowa, co ograniczona ilość struktur mogących wpasować się w to miejsce [177–179]. Spośród naturalnych aminokwasów zauważono wyraźną preferencję dla L-Pro, co miało miejsce też w przypadku APC. Dodatkowo kieszeń ta pomieścić może także resztę Gly [71, 82, 176, 180, 181]. Kieszeń S2 czynnika Xa również dobrze rozpoznaje resztę Gly, chociaż jest również zdolna do wiązania większych struktur, takich jak L-Phe oraz L-Ser [82, 182]. Kieszenie S3 APC, trombiny i czynnika Xa

w porównaniu do kieszeni S2 posiadają bardzo szeroki profil specyficzności substratowej. Rozpoznawane są praktycznie wszystkie naturalne aminokwasy. Brak aktywności tych enzymów zauważono jedynie względem L-Pro, co jest kolejną cechą łączącą specyficzność APC, trombiny i czynnika Xa. Można zauważyć jedynie lekką preferencję czynnika Xa względem L-Arg w porównaniu do reszty aminokwasów [71, 82, 182, 183]. W pozycji P4 wszystkie enzymy wykazują preferencje względem alifatycznych aminokwasów takich jak L-Ile, L-Leu, L-Nle [71, 82, 184]. Aktywności tych enzymów względem wyżej wymienionych reszt jest na tyle zbliżona, że nie ma możliwości odróżnić ich między sobą (Rysunek 11).



Rysunek 11. Schematycznie przedstawiona specyficzność substratowa APC, trombiny i czynnika Xa w kieszeniach P4-P1, gdzie „AA” oznacza aminokwas [71, 82, 157, 175, 176, 182, 183].

Jak wspomniano wcześniej, kaskada krzepnięcia jest procesem, w których proteazy serynowe, krążące w krwiobiegu jako nieaktywne zymogeny, są aktywowane, a następnie działają jako katalizatory aktywując kolejne czynniki krzepnięcia [128]. Oznacza to, iż jednym z głównych naturalnych substratów dla czynników krzepnięcia są sekwencje hydrolizowane w zymogenach przez nie aktywowanych. W Tabeli 2 zebrane zostały przykłady istotnych substratów fizjologicznych APC, trombiny i czynnika X wraz z ich sekwencją peptydową w pozycjach P4-P1.

Tabela 2. Przykładowe substraty fizjologiczne APC, trombiny i czynnika Xa.

proteaza	substrat	sekwencja [P4-P1]
APC	czynnik Va	Lys-Lys-Thr-Arg [167]
	czynnik Va	Leu-Asp-Gln-Arg [167]
	czynnik VIIIa	Val-Asp-Gln-Arg [185]
	czynnik VIIIa	Ile-Glu-Pro-Arg [185]
trombina	czynnik V	Leu-Gly-Ile-Arg [186]
	czynnik V	Leu-Ser-Pro-Arg [186]
	czynnik V	Trp-Tyr-Leu-Arg [71]
	czynnik VIII	Ile-Gln-Ile-Arg [187]
	czynnik VIII	Ile-Glu-Pro-Arg [187]
	czynnik VIII	Gln-Ser-Pro-Arg [187]
	czynnik XI	Ile-Lys-Pro-Arg [188]
	PC	Val-Asp-Pro-Arg [189]
	fibrynogen A α	Gly-Gly-Val-Arg [190]
	fibrynogen B β	Phe-Ser-Ala-Arg [71]
czynnik Xa	protrombina	Ile-Glu-Gly-Arg [82]
	protrombina	Ile-Asp-Gly-Arg [82]

Sekwencje endogennych substratów zidentyfikowanych dla APC, trombiny i czynnika Xa odzwierciedlają profile specyficzności substratowej tych proteaz uzyskane różnymi technikami. Wszystkie substraty posiadają konserwatywną resztę L-Arg w pozycji P1. W przypadku APC preferencja względem alifatycznych oraz zasadowych aminokwasów w pozycji P4 bardzo dobrze przekłada się na sekwencje hydrolizowane *in vivo*. W przypadku trombiny duża część fizjologicznych substratów posiada resztę L-Pro w pozycji P2 oraz L-Ile i L-Leu w pozycji P4. Taka sama sytuacja ma miejsce w przypadku substratów czynnika Xa, które w swojej strukturze posiadają Gly w pozycji P2 oraz L-Ile w pozycji P4, co idealnie pokrywa się z wynikami otrzymanymi przy użyciu metody PS-SCL [82, 182].

W celu określenia funkcji czynników krzepnięcia niezbędne jest otrzymanie selektywnych substratów umożliwiających badanie ich aktywności w procesach fizjologicznych jak i patofizjologicznych. W związku z istnieniem ogólnej ogromnej ilości proteaz oraz podobieństwami w budowie miejsca aktywnego enzymów należące do tej samej rodziny dokładna ich identyfikacja w złożonych próbkach biologicznych może być niedokładna i myląca.

Dla APC, Butenas oraz współpracownicy zsyntetyzowali 87 fluorogenicznych substratów, które posiadały różne naturalne reszty aminokwasowe w pozycjach P4, P3 i P2 oraz stałą resztę L-Arg w pozycji P1 [183]. Następnie sprawdzono selektywność otrzymanych sekwencji względem trombiny i czynnika Xa. Porównanie uzyskanych wydajności katalitycznych k_{kat}/K_M wykazało, iż użycie jedynie naturalnych aminokwasów w strukturze substratów nie pozwala na odróżnienie APC od trombiny i czynnika Xa. Większość substratów rozpoznawana była przez APC lepiej niż przez czynnik Xa, ale niestety na podobnym poziomie jak przez trombinę. Obiecująca sekwencja Leu-Ser-Thr-Arg o wartości k_{kat}/K_M na poziomie $22000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ rozpoznawana była 22-krotnie lepiej przez APC niż przez trombinę, ale już tylko 11-krotnie lepiej porównując z czynnikiem Xa. Przykładem substratu, który wykazywał się wysokim współczynnikiem selektywności APC/czynnik Xa był tripeptyd Val-Lau-Arg. Substrat ten posiadał wartość k_{kat}/K_M na poziomie $58000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ i był 150 razy lepiej hydrolizowany przez APC niż przez czynnik Xa, ale nie był selektywny, jeśli chodzi o trombinę (jedynie 2,6-krotnie lepiej rozpoznawany przez APC) [183].

Syntetyczne substraty takie jak Ac-Nle-Thr-Pro-Arg-AMC oraz Ac-Val-Thr-Pro-Arg-AMC zaprojektowane dla trombiny przez Backesa i współpracowników osiągały wysokie wartości współczynnika k_{kat}/K_M na poziomie 3830000 oraz $1040000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [71]. Zamiana jedynie jednej reszty, z L-Arg na L-Lys jak w sekwencji Ac-Nle-Thr-Pro-Lys-AMC zaproponowanej przez Harris i współpracowników spowodowała znaczny spadek aktywności do $260000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [82]. Kilka sekwencji zostało także zaproponowanych przez grupę Hellmana, z których najlepsze okazały się być substraty z L-Arg w pozycji P1, L-Pro w pozycji P2 oraz L-Leu w pozycji P4, takie jak Leu-Thr-Pro-Arg oraz Leu-Trp-Pro-Arg [170]. Żadna z wyżej wymienionych struktur nie posiada jednak odpowiedniej selektywności, co wyklucza możliwość ich użycia w złożonym środowisku ludzkiego osocza, w którym obecne są wszystkie czynniki krzepnięcia [16, 191].

Substraty zaprojektowane dla czynnika Xa tak samo jak w przypadku APC i trombiny posiadały w swojej strukturze jedynie naturalne aminokwasy, co uniemożliwiło uzyskanie oczekiwanej selektywności. W badaniach prowadzonych przez Gosalię i współpracowników do najbardziej aktywnych należały sekwencje Ac-Ala-Phe-Phe-ACC, Ac-Phe-Phe-Phe-Arg-ACC oraz Ac-Phe-Phe-Gly-Arg-ACC [182].

1.6.3. Inhibitory aktywności APC, trombiny i czynnika Xa

Kaskada krzepnięcia krwi jest idealnie skonstruowanym procesem utrzymującym hemostazę i zapobiegającym samoistnemu krwawieniu. Aby przeciwdziałać niepożądanym uszkodzeniom w organizmie, aktywność proteaz serynowych zaangażowanych w koagulację musi być ściśle kontrolowana. U ludzi wykształcił się mechanizm chroniący przed zaburzeniami aktywności czynników krzepnięcia, którym jest ekspresja endogennych inhibitorów. Endogennym inhibitorem APC jest PCI (ang. *protein C inhibitor*) znany również jako SERPINA5 [192]. Wiadomo jednak, że ten inhibitor proteaz serynowych nie jest selektywny względem APC. Blokuje on także inne czynniki krzepnięcia, takie jak trombina i czynnik Xa [193]. Do inhibitorów trombiny, poza APC i PCI należy antytrombina, która poza inhibicją trombiny, blokuje również aktywność czynnika Xa [194]. W przypadku czynnika Xa do jego endogennych inhibitorów należy ZPI (ang. *protein Z-dependent protease inhibitor*), który należy do grupy inhibitorów proteaz serynowych – serpin. Podobnie jak w przypadku wyżej wymienionych naturalnych inhibitorów, ZPI nie jest selektywnym związkiem, ponieważ jest w stanie dezaktywować czynnik XIa [195]. Brak selektywności endogennych inhibitorów czynników krzepnięcia dodatkowo podkreśla podobieństwo strukturalne tych proteaz oraz zbliżoną specyficzność substratów ich miejsc aktywnych. Liczne przykłady stanów patofizjologicznych wynikających z nadmiernej aktywności lub obniżonego poziomu proteaz wymienione w podrozdziale 1.6.1. świadczą jednak o tym, że w układzie endogennych inhibitorów czynników krzepnięcia dochodzi do „awarii”. Dlatego otrzymanie nowych, syntetycznych i selektywnych inhibitorów proteaz serynowych zaangażowanych w kaskadę krzepnięcia stało się głównym celem wielu grup badawczych z całego świata. Takie struktury mogą mieć szerokie zastosowanie jako narzędzia do badania funkcji czynników *in vitro* i *in vivo*. Dodatkowo mogą także znaleźć zastosowanie terapeutyczne.

Blokowanie naturalnych antykoagulantów wzbudza duże zainteresowanie naukowców i stało się obiecującą strategią w terapii hemofilii, co potwierdzają wstępne wyniki badań klinicznych [196, 197]. APC jest jednym z takich fizjologicznie ważnych antykoagulantów, a przeprowadzone badania na myszach sugerują, że jego selektywna inhibicja sprzyja hemostazie w hemofilii [198, 199]. Już pod koniec XX wieku opracowane zostały pierwsze związki pozwalające na blokowanie aktywności APC. W 1997 roku Gal i współpracownicy otrzymali aptamer RNA (APC-167) o wysokim powinowactwie do APC,

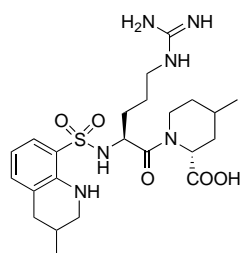
który nie wiąże się z trombiną ani czynnikiem Xa [200]. Następnie w 2001 roku powstał kolejny inhibitor APC, alfa-2-makroglobulina (α_2 -M), który niestety poza blokowaniem APC, wchodził w reakcję krzyżową z trombiną [201]. W 2006 roku powstała seria kilkunastu małych cząsteczkowych inhibitorów peptydowych, które w swojej strukturze posiadały również kilka nienaturalnych aminokwasów. Część z nich wykazywała nawet selektywność względem APC i była słabo rozpoznawana przez trombinę [202]. Zespół Huntingtona [175, 176] jako inhibitor APC zaproponował serpinę PC – α_1 AT, której pozytywne działanie potwierdzone zostało u myszy z hemofilią A. Jedną z najnowszych prac ukazała się w 2020 roku i dotyczyła przeciwciała monoklonalnego, które blokowało aktywność APC, wiążąc się z miejscem oddalonym od centrum aktywnego proteazy. Przeciwciało to (TPP-4885/BAY1896502) testowane było u małych zwierząt z hemofilią. Okazało się być dobrze tolerowane oraz pozwoliło na zwiększenie wytwarzania trombiny, promując tym samym krzepnięcie krwi [199].

Choroby zakrzepowo-zatorowe są główną przyczyną możliwej do uniknięcia śmiertelności w krajach rozwijających się i rozwiniętych, odpowiedzialną za około 18 milionów zgonów rocznie na całym świecie [145, 203]. Terapia przeciwzakrzepowa jest podstawą profilaktyki i leczenia zaburzeń zakrzepowych, jednak konwencjonalne antykoagulanty skutecznie stosowane w ciągu ostatniej dekady (heparyny o dużej i małej masie cząsteczkowej oraz antagoniści witaminy K (ang. *vitamin K antagonists*, VKAs)) przedkładają korzyści przeciwzakrzepowe nad ryzyko krwawienia [204, 205]. W celu przewyższenia tych ograniczeń i uzyskania lepszych wyników niż obecnie stosowane standardy terapeutyczne, priorytetem stały się szeroko zakrojone badania nad opracowaniem nowych leków przeciwzakrzepowych. Niedawno zatwierdzone doustne antykoagulanty niebędące antagonistami witaminy K (ang. *direct oral anticoagulants*, DOACs), ukierunkowane na proteazy wspólnego szlaku krzepnięcia (trombinę i czynnik Xa), osiągnęły bardzo dużą skuteczność i bezpieczeństwo, a dzięki lepszej farmakokinetyce od ich poprzedników i bardziej przewidywalnemu dawkowaniu rozwiązały wiele problemów związanych z VKAs [205–207].

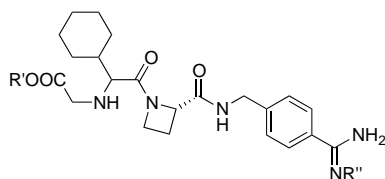
Przykładem DOACs mogą być małowcząsteczkowe inhibitory, takie jak argatroban, melagatran (w postaci proleku – ximelagatran) i dabigatran (w postaci proleku – dabigatran etexilate), których zadaniem jest blokowanie miejsca aktywnego trombiny oraz apixaban i rivaroxaban, które regulują aktywność czynnika Xa [208, 209] (Rysunek 12). Co ciekawe, poza działaniem przeciwzakrzepowym, inhibitory trombiny i czynnika Xa mogą wywierać wiele potencjalnych korzyści terapeutycznych, w tym działanie przeciwzapalne i przeciwwirusowe. Uważa się, że argatroban, apixaban i rivaroxaban stanowią obietnicę w leczeniu ciężkich przypadków choroby COVID-19 wywołanej przez wirusa SARS-CoV-2 [161, 210]. Małe bezpośrednie inhibitory trombiny (ang. *direct thrombin inhibitors*, DTI) zyskały w ciągu ostatniej dekady dużą popularność jako alternatywne metody leczenia przeciwzakrzepowego. Główną klasą DTI są inhibitory peptydowe i peptydomimetyki. Przykładem może być seria prostych dipeptydów w których reszty L-Lys/L-Arg i L-Pro/L-Pip znajdują się odpowiednio w pozycjach P1 i P2 [211]. W oparciu o oryginalny tripeptyd Phe-Pro-Arg [211] firma AstraZeneca opracowała melagatran, który w postaci proleku, ximelagatranu, był pierwszym doustnym lekiem przeciwzakrzepowym od czasu wprowadzenia warfaryny [212]. Wiele DTI zostało pozyskanych w naturalny sposób, tak jak w przypadku hirudyny otrzymanej z pijawki lekarskiej *Hirudo medicinalis* [213]. Inną klasą inhibitorów są inhibitory allosteryczne. Przykładem mogą być aptamery hamujące działanie trombiny uzyskane przez Bocka i współpracowników [214].

Ciekawa jest także koncepcja utworzenia inhibitora, który hamowałby jednocześnie aktywność trombiny i czynnika Xa. Blokowanie dwóch kluczowych czynników krzepnięcia jest obarczone dużym ryzykiem zaburzenia hemostazy i mogłoby wywołać wewnętrzne krwawienie. Aby tego uniknąć powstała koncepcja makromolekuły o potrójnej aktywności. Firma Endotis Pharma opracowała taki antykoagulant o potrójnym działaniu, zwany EP217609. W swojej strukturze posiada on pentasacharyd heparyny, który wiąże antytrombinę i aktywuje ją do selektywnego hamowania czynnika Xa. Kolejna część – DTI odpowiada za blokowanie trombiny. Z kolei biotyny umożliwia związaną cząsteczkę inhibitora z awidyną, co wspomaga usunięcie inhibitora zmniejszając działanie przeciwzakrzepowe [215–217].

inhibitory trombiny

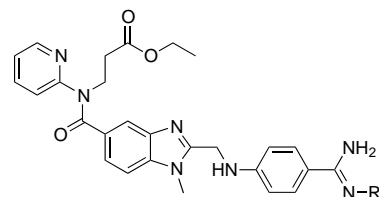


argatroban



melagatran R' = -H, R'' = -H

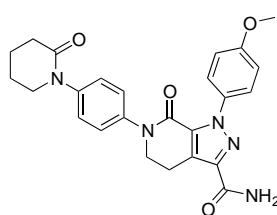
ximelagatran R' = -CH₂CH₃, R'' = -OH



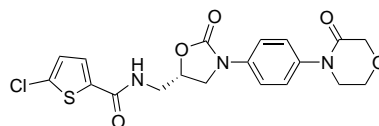
dabigatran R = -H

dabigatran etexilate R = -COO(CH₂)₅CH₃

inhibitory czynnika Xa



apixaban

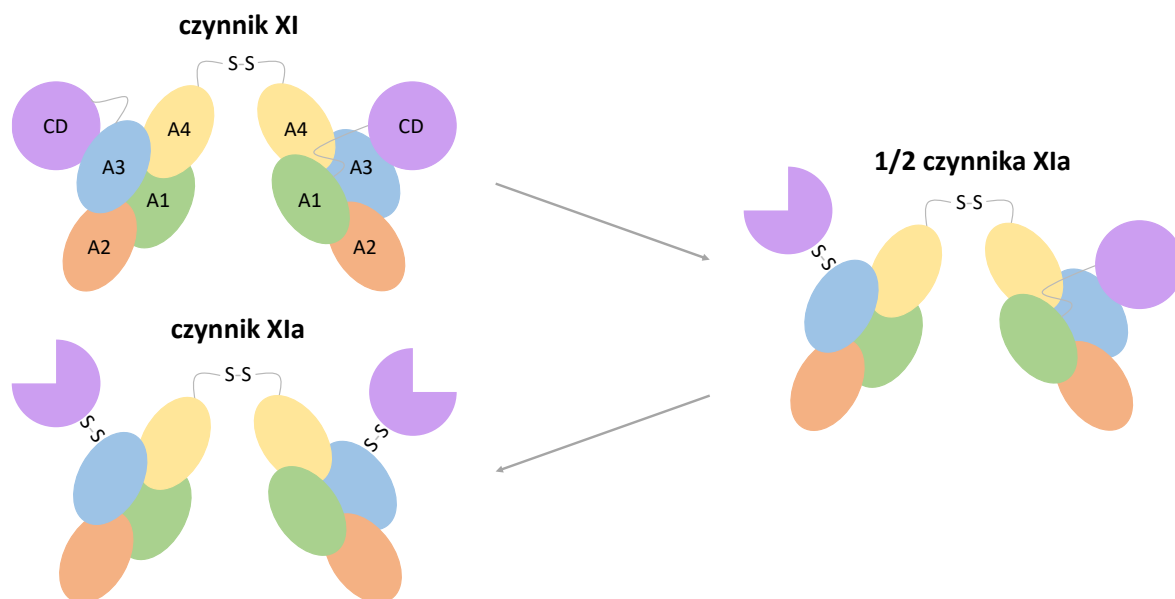


rivaroxaban

Rysunek 12. Struktura przykładowych DOACs – inhibitorów trombiny i czynnika Xa [208, 209].

1.7. Czynniki XIa – budowa, funkcja i udział w stanach patofizjologicznych

W ostatnich latach czynnik XI zyskał zainteresowanie naukowców z kilku powodów. Proteaza ta krąży we krwi jako homodimer składający się z dwóch podjednostek o masie 80 kDa, co stanowi unikalną konfigurację wśród enzymów proteolitycznych zaangażowanych w kaskadę krzepnięcia. Każda podjednostka zawiera cztery powtórzenia zwane białkowymi domenami jabłkowymi (A1-A4) (ang. *apple domains*) oraz trypsynopodobną domenę katalityczną (CD) (ang. *catalytic domain*) [218, 219] (Rysunek 13). Czynniki XI nie posiadają domeny Gla wiążącej wapń, co jeszcze bardziej odróżnia go strukturalnie od dobrze scharakteryzowanych proteaz krzepnięcia zależnych od witaminy K (czynników II, VII, IX, X i białka C) [219]. Czynniki XI jest zymogenem proteazy serynowej i jest przekształcany do swojej aktywnej postaci (XIa) poprzez hydrolizę wiązania peptydowego Arg369-Ile370. Czynniki XI aktywowane mogą zostać przez czynnik XIIa we wczesnym etapie szlaku wewnątrzpochodnego, przez trombinę w pętli wzmacniającej lub przez sam czynnik XIa [220, 221]. Fizjologiczną funkcją czynnika XIa jest aktywacja jego substratu, czynnika IX, poprzez selektywną hydrolizę wiązań peptydowych Arg145-Ala146 i Arg180-Val181 [219]. W ten sposób pobudza on krzepnięcie i przyczynia się do wytwarzania fibryny [222, 223].



Rysunek 13. Budowa czynnika XI oraz jego aktywacja do czynnika XIa. Każda podjednostka czynnika XI jest aktywowana przez hydrolizę wiązania peptydowego między Arg369 i Ile370. Aktywacja przebiega przez pośredni etap z jedną zhydrolizowaną podjednostką (1/2-XIa). Na schemacie domeny A1, A2, A3 i A4 przedstawiono odpowiednio kolorem zielonym, pomarańczowym, niebieskim i żółtym, a domeny katalityczne (CD) – kolorem fioletowym. Kółka oznaczają nieaktywowane domeny katalityczne, a 3/4 kółka – aktywowane domeny katalityczne.

Zachwianie naturalnie występującego stężenia czynnika XIa w osoczu jest związane z kilkoma zaburzeniami. Wrodzony jego niedobór, znany jako hemofilia C, jest rzadkim w populacji schorzeniem (1 na milion), ale stosunkowo częstym wśród Żydów aszkenazyjskich (8% tej populacji) [224, 225]. W porównaniu z niedoborem czynników VIII (hemofilia A) i IX (hemofilia B) chorzy na hemofilię C rzadko wykazują spontaniczne krwawienia. Niedobór czynnika XI zwykle powoduje jedynie łagodne krwawienia, najczęściej po urazach lub zabiegach chirurgicznych, co sugeruje, że czynnik XI odgrywa ograniczoną rolę w prawidłowej hemostazie [144, 226]. Z kolei podwyższona aktywność czynnika XIa wiąże się ze zwiększonym ryzykiem niedokrwiennego udaru mózgu [133, 227], zakrzepicy żył głębokich [228, 229] i zawału serca [230]. Dane te sugerują, iż czynnik XIa odgrywa ważną rolę w chorobach zakrzepowo-zatorowych, które są główną przyczyną śmiertelności i odpowiadają za jeden na cztery zgony na całym świecie [145]. Wszystkie obecnie dostępne antykoagulanty skutecznie zapobiegające zakrzepicy działają poprzez hamowanie jednego lub więcej elementów szlaku zewnątrzpo pochodnego i wspólnego. Ponieważ szlaki te odgrywają główną rolę w inicjacji tworzenia skrzepu i są niezbędne dla hemostazy, terapie skierowane na nie mogą znacząco zwiększyć ryzyko krwawienia [207, 231]. Z kolei proteaza XIa działająca na drodze wewnątrzpo pochodnej,

przyczynia się do powstawania zakrzepów, ale odgrywa niewielką rolę w hemostazie. Ostatnie badania kliniczne sugerują, że czynnik XIa może być potencjalnym alternatywnym celem terapeutycznym, umożliwiającym osiągnięcie korzyści przeciwzakrzepowych przy zmniejszonym ryzyku krwawienia w porównaniu z antagonistami witaminy K, heparynami oraz bezpośrednimi inhibitorami trombiny i czynnika Xa [231, 232] (temat ten jest dokładniej omówiony w podrozdziale 1.7.2.).

1.7.1. Preferencje katalityczne oraz substraty do badania aktywności czynnika XIa

Proteaza szlaku krzepnięcia XIa została po raz pierwszy zidentyfikowana przez Roberta Rosenthala i jego współpracowników w 1953 roku i od tego czasu jest intensywnie badana zarówno przez firmy farmaceutyczne jak i środowisko akademickie [139, 218]. Profil specyficzności substratowej czynnika XIa został wcześniej określony na podstawie sekwencji fizjologicznych substratów [233, 234] oraz struktury krystalicznej domeny katalitycznej czynnika XIa [134]. Profile te obejmują jednak tylko naturalne aminokwasy, co znacznie ograniczyło rozwój selektywnych narzędzi chemicznych umożliwiających odróżnienie czynnika XIa od innych proteaz zaangażowanych w kaskadę krzepnięcia krwi. W strukturze krystalicznej miejsca aktywnego czynnika XIa znajduje się pętla utworzona przez mostek solny pomiędzy *N*-końcową grupą aminową Ile370, a łańcuchem bocznym Asp554. Jest ona na tyle duża, że ma możliwość reakcji z grupą guanidynową argininy [134]. Wcześniejsze badania wykazały, iż kieszeń S1 czynnika XIa jest nie tylko szeroka i głęboka, ale też wysoce konserwowana i może oddziaływać wyłącznie z dodatnio naładowaną arginina, co obserwuje się również w przypadku innych enzymów z kaskady krzepnięcia, takich jak wcześniej omawiane proteazy zależne od witaminy K – APC, trombina i czynnik Xa [151, 174]. Preferencja dla argininy w pozycji P1 została również wcześniej odnotowana w dwóch fizjologicznie istotnych substratach czynnika XIa, sekwencjach hydrolizowanych w strukturze czynnika IX (Lys-Leu-Thr-Arg, Asp-Phe-Thr-Arg) [233, 234] (Tabela 3).

Tabela 3. Specyficzność substratowa czynnika XIa w pozycjach P4-P1 na podstawie danych umieszczonych w bazie MEROPS [184].

P4	P3	P2	P1
Lys/Asp/Ala/Ile/Glu	Leu/Phe/Gln/Glu/Lys	Thr/Pro/Ala/Leu/Trp/Ser/His	Arg

Mimo dużego zainteresowania tą niezwykle w strukturze proteazą do tej pory nie znaleziono selektywnych substratów umożliwiających detekcję czynnika XIa. Użycie jedynie naturalnych aminokwasów nie jest w tym przypadku wystarczające. Przykładem może być seria czternastu tripeptydowych substratów ze znacznikiem 4-nitroanilidowym (NA) typu Z-AA-Gly-Arg-NA i Z-AA-Phe-Arg-NA, gdzie AA = Ala, Asn, Glu, Lys, Phe, Pro lub Ser. Selektowność tych związków badana była względem kilku czynników krzepnięcia w tym APC, trombiny, czynnika Xa i czynnika XIa. W porównaniu do pozostałych czynników, czynnik XIa wykazywał się umiarkowaną aktywnością, a najlepszym dla niego substratem był Z-Glu-Gly-Arg-NA z wartością k_{kat}/K_M na poziomie $4100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Żadna ze struktur nie posiadała jednak odpowiedniej selektowności. Wszystkie substraty były lepiej rozpoznawane przez chociaż jedną inną proteazę z kaskady krzepnięcia [235]. Podobnie sytuacja wygląda w kontekście markerów chemicznych umożliwiających obrazowanie aktywności czynnika XIa. Obecnie nie ma żadnej struktury pozwalającej na selektywne znakowanie czynnika XIa w próbkach biologicznych. Bardzo dużo uwagi poświęcono jednak uzyskaniu różnego typu inhibitorów tej proteazy o odmiennym mechanizmie działania, które dokładniej omówiono w kolejnym podrozdziale.

1.7.2. Inhibitory aktywności czynnika XIa

Mimo że obecnie stosowane inhibitory trombiny i czynnika Xa mają bardziej przewidywalne właściwości farmakologiczne i są skuteczne w zapobieganiu zakrzepicy, przyczyniają się one również do hemostazy i mogą powodować powikłania krwotoczne. Dlatego nadal istnieje zapotrzebowanie na skuteczniejsze leki przeciwzakrzepowe o zmniejszonym ryzyku krwawienia [205, 223, 236]. Ostatnie badania kliniczne wskazują na proteazy szlaku wewnątrzpochodnego, znajdujące się na wcześniejszym etapie kaskady krzepnięcia jako alternatywne cele bezpieczniejszej antykoagulacji [237, 238]. Szczególne zainteresowanie budzi czynnik XI, ponieważ u chorych na hemofilię C z niedoborem czynnika XI rzadko dochodzi do samoistnego krwawienia, co wskazuje, że szlak wewnątrzpochodny nie jest potrzebny do codziennej hemostazy [231, 239]. Ponadto dane

epidemiologiczne wykazują, że osoby z wrodzonym niedoborem czynnika XI rzadziej niż populacja ogólna zapadają na żylną chorobę zakrzepowo-zatorową i udar niedokrwienny mózgu [205, 240–242].

W ostatnich latach czynnik XIa stał się obiecującym celem dla nowych leków przeciwzakrzepowych, dlatego nacisk położono na opracowanie jego selektywnych inhibitorów [205, 243]. Istnieją również badania wskazujące na potencjał inhibitorów czynnika XI/XIa w listeriozie, sepsie i nadciśnieniu tętniczym [223, 244–246]. Dotychczas odkryto kilka strategii farmakologicznych ukierunkowanych na czynnik XIa. Przykładem są antysensowne oligonukleotydy (ang. *antisense oligonucleotides*, ASO) i przeciwciała monoklonalne (MAb) blokujące aktywację lub aktywność czynnika XIa. Innymi inhibitorami mogą być aptamery, inhibitory małowcząsteczkowe czy też naturalnie występujące struktury, które bezpośrednio blokujące miejsce aktywne lub działają jak inhibitory allosteryczne [205, 223, 247, 248] (wybrane inhibitory wraz z ich mechanizmem działania przedstawiono w Tabeli 4). Większość z tych leków znajduje się we wczesnej fazie rozwoju, ale jeden z nich osiągnął już II fazę badań klinicznych. IONIS-416858, specyficzny względem czynnika XI ASO, był stosowany u pacjentów poddawanych całkowitej alloplastyce stawu kolanowego i okazał się bezpieczny i skuteczny w zwalczaniu zakrzepicy żyłnej przy ograniczonym ryzyku krwawienia w porównaniu z leczeniem enoksaparyną (zaliczaną do heparyn drobnocząsteczkowych), powszechnie stosowanym inhibitorem wspólnego odcinka kaskady krzepnięcia krwi [205, 247]. Mimo obiecujących wyników każde z tych podejść ma zalety i ograniczenia. Wyzwaniem jest opracowanie cząsteczek o optymalnym profilu farmakokinetycznym, odpowiednich sposobach przyjmowania i dostarczania leku, a co ważniejsze, identyfikacja związków o wystarczającej selektywności w stosunku do innych proteaz z kaskady krzepnięcia. To ostatnie wydaje się być głównym celem większości obecnych badań nad inhibitorami czynnika XI/XIa [223, 249].

Tabela 4. Wybrane rodzaje inhibitorów czynnika XI/XIa wraz z ich przykładami oraz mechanizmem działania.

cel	typ inhibitora	przykład	mechanizm działania
XI/XIa	przeciwciała monoklonalne	O1A6 (aXIMAb) [250]	wiąże się z domeną A3 XIa hamując aktywację IX
		14E11 [251]	wiąże się z domeną A2 XI hamując jego aktywację przez XIIa
	antysensowne oligonukleotydy	Anty-fXI ASO [252]	hamuje wytwarzanie XI
	inhibitory miejsca aktywnego	pochodna kwasu aryloboronowego [253]	nieodwracalnie hamują miejsce aktywne XIa
		peptydomimetyki [254]	nieodwracalnie hamują miejsce aktywne XIa
		BMS-262084 [255]	nieodwracalnie hamuje miejsce aktywne XIa
	inhibitory allosteryczne	SPGG (ang. <i>sulfated pentagalloylglucoside</i>) [256]	wiąże się z dodatnio naładowanymi resztami w domenie katalitycznej XIa, co prowadzi do zmiany konformacji miejsca aktywnego
	naturalne inhibitory	Clavatadine A [257]	inhibitor miejsca aktywnego XIa wyizolowany z gąbki morskiej <i>Suberea clavata</i>
		Desmolaris [258]	inhibitor miejsca aktywnego XIa wyizolowany ze śliny nietoperza <i>Desmodus rotundus</i>
	XII/XIIa	przeciwciała monoklonalne	3F7 [259]
15H8 [260]			wiąże się z łańcuchem ciężkim XII hamując jego aktywację
antysensowne oligonukleotydy		Anty-fXII ASO [261]	hamuje wytwarzanie XII
inhibitory małocząsteczkowe		bicykliczny peptyd 3 [262]	wiąże się z XII hamując jego aktywację
aptamery RNA		R4cfXII-1 [263]	wiąże się z XII hamując jego aktywację oraz z XIIa hamując aktywację XI

2. CEL PRACY

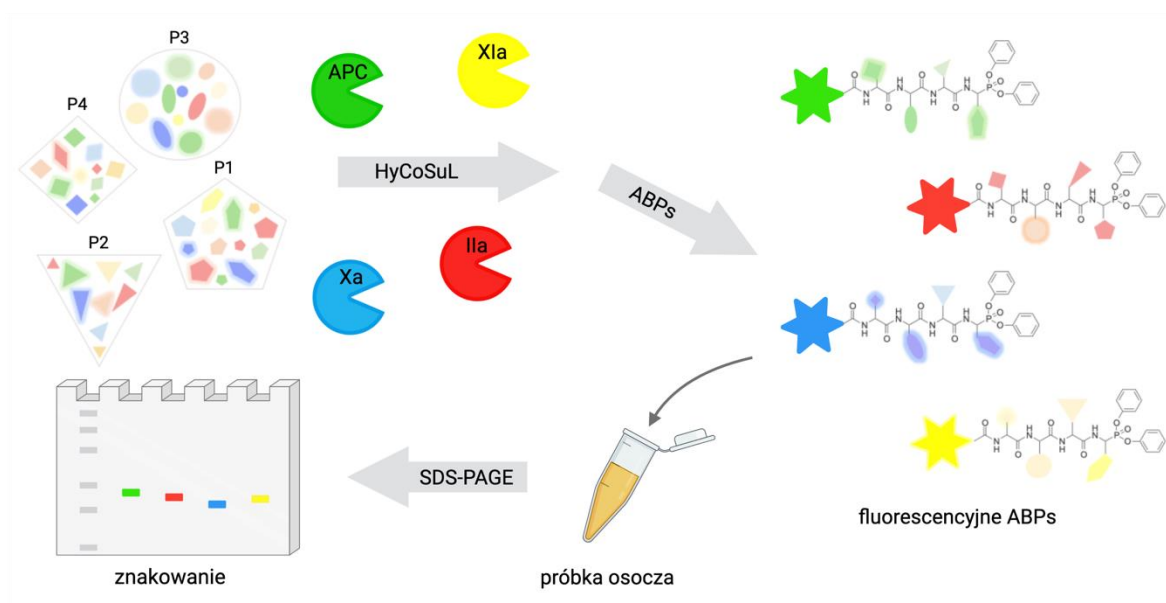
Aktywowane białko C (APC), trombina i czynnik Xa to pokrewne proteazy serynowe zależne od witaminy K, które są kluczowymi czynnikami w procesie krzepnięcia krwi. Znajdują się one na końcowym etapie ścieżki koagulacyjnej i poza utrzymaniem prawidłowej hemostazy, odgrywają ważną rolę w procesach zapalnych, apoptozie, włóknieniu, angiogenezie i infekcjach wirusowych. Nieprawidłowa aktywność tych czynników jest związana z wieloma schorzeniami, takimi jak hemofilia, zakrzepica, choroba Alzheimera, sepsa, stwardnienie rozsiane i COVID-19. W ostatnich latach dużym zainteresowaniem cieszy się również czynnik XIa wchodzący w skład szlaku wewnątrzpochodnego. Różni się on strukturalnie od wcześniej wspomnianych proteaz, a dodatkowo odgrywa także ograniczoną rolę w codziennej hemostazie. Otrzymane do tej pory dane świadczą jednak o istotnym znaczeniu czynnika XIa w chorobach zakrzepowozatorowych. Pomimo znacznego postępu w zrozumieniu układu krzepnięcia, nie ustalono jeszcze w pełni ról APC, trombiny, czynnika Xa i czynnika XIa w procesach fizjologicznych oraz różnych stanach chorobowych. Wynika to głównie ze złożoności szlaków sygnalizacyjnych, w którym uczestniczą te enzymy oraz z braku wystarczająco czułych i selektywnych metod wykrywania poziomu i aktywności poszczególnych czynników krzepnięcia.

Dlatego też, opracowanie selektywnych narzędzi chemicznych umożliwiających monitorowanie, obrazowanie i rozróżnianie czynników krzepnięcia w próbkach biologicznych stanowi główny cel niniejszej rozprawy doktorskiej. W pracy zakładano, iż wykorzystanie bibliotek substratów fluorogenicznych zawierających kombinację naturalnych i dużej puli nienaturalnych aminokwasów umożliwi dokładne zbadanie kieszeni wiążących w miejscu aktywnym enzymów. Z założenia uzyskane profile specyficzności substratowej pozwolą na otrzymanie zestawu dedykowanych każdej proteazie substratów. Najbardziej selektywne sekwencje mogłyby zostać przekształcone w inhibitory i fluorescencyjne markery chemiczne (ABPs), które następnie wykorzystać można do szybkiego, bezpośredniego i jednoczesnego wykrywania APC, trombiny, czynnika Xa i czynnika XIa w ludzkim osoczu.

Rozprawa doktorska wykonana została w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod opieką prof. dra hab. Marcina Drąga oraz dr inż. Pauliny Kasperkiewicz-Wasilewskiej. Badania

finansowane były w ramach grantu TEAM (2017-4/32) Fundacji na rzecz Nauki Polskiej. Część badań obejmująca otrzymanie oczyszczonych czynników krzepnięcia oraz krwi pełnej została wykonana we współpracy z prof. Jamesem Huntingtonem (Department of Haematology, Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge) oraz dr n. med. Stanisławem Potoczkiem (Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu). Poszczególne etapy realizacji postawionych celów badawczych obejmowały (Rysunek 14):

1. Określenie specyficzności substratowej wybranych proteaz serynowych kaskady krzepnięcia krwi (APC, trombiny, czynnika Xa i XIa) w pozycjach P4-P1 wykorzystując metody chemii kombinatorycznej – technologię HyCoSuL.
2. Projektowanie i syntezę tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych.
3. Opracowanie zestawu inhibitorów i markerów chemicznych oraz badanie ich selektywności za pomocą kinetyki enzymatycznej oraz analizy SDS-PAGE i Western blot.
4. Optymalizację metody oraz jednoczesną wizualizację czynników krzepnięcia krwi w ludzkim osoczu.



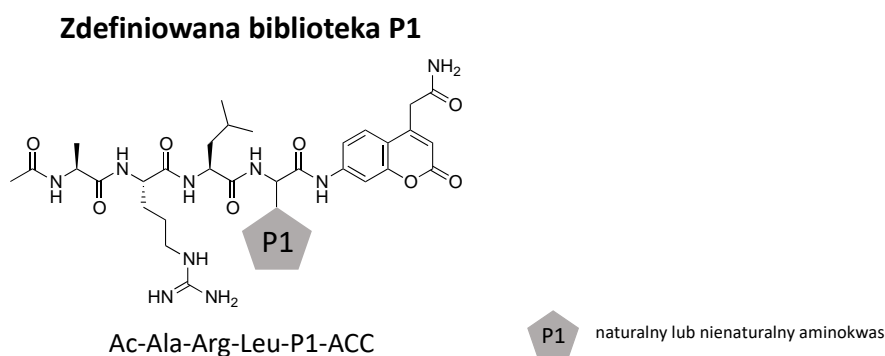
Rysunek 14. Schemat przedstawiający główne cele i założenia niniejszej rozprawy doktorskiej.

3. BADANIA WŁASNE

3.1. Określenie profilu specyficzności substratowej czynników krzepnięcia w pozycjach P4-P1

3.1.1. Zdefiniowana biblioteka do badania specyficzności substratowej kieszeni S1

APC, trombina oraz czynniki Xa i XIa należą do rodziny proteaz serynowych o trypsynopodobnej aktywności, co oznacza, że rozpoznają one i hydrolizują wiązania peptydowe po zasadowych resztach aminokwasowych [134, 151, 174]. Według bazy MEROPS to właśnie zasadowe L-Arg oraz L-Lys najczęściej występują w pozycji P1 w substratach rozpoznawanych przez te enzymy. Nakładająca się specyficzność substratowa tych proteaz znacznie utrudnia opracowanie selektywnych narzędzi chemicznych do badania szlaku krzepnięcia krwi, dlatego w celu dokładnego określenia charakteru kieszeni S1 wykorzystano zdefiniowaną bibliotekę o strukturze Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC zawierającą 133 indywidualne substraty fluorogeniczne [93]. Biblioteka ta została wcześniej opracowana i zsyntetyzowana w laboratorium prof. Marcina Dęga w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania i ma uniwersalną strukturę tak, aby mogła zostać wykorzystana do badania wielu enzymów proteolitycznych. Posiada ona znacznik fluorogeniczny ACC (7-amino-4-karbamoilometylokumaryna) umożliwiający obserwację przyrostu fluorescencji w czasie, zmienną pozycję P1, w której skład wchodzi naturalne i nienaturalne aminokwasy, stały motyw P4-P2 (Ala-Arg-Leu) oraz acetylowany *N*-koniec (Rysunek 15). Biblioteka Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC doskonale wpisuje się w preferencje substratowe proteaz z kaskady krzepnięcia, a dzięki stałemu motywowi Ala-Arg-Leu jest rozpoznawana przez APC, trombinę oraz czynniki Xa i XIa [184].



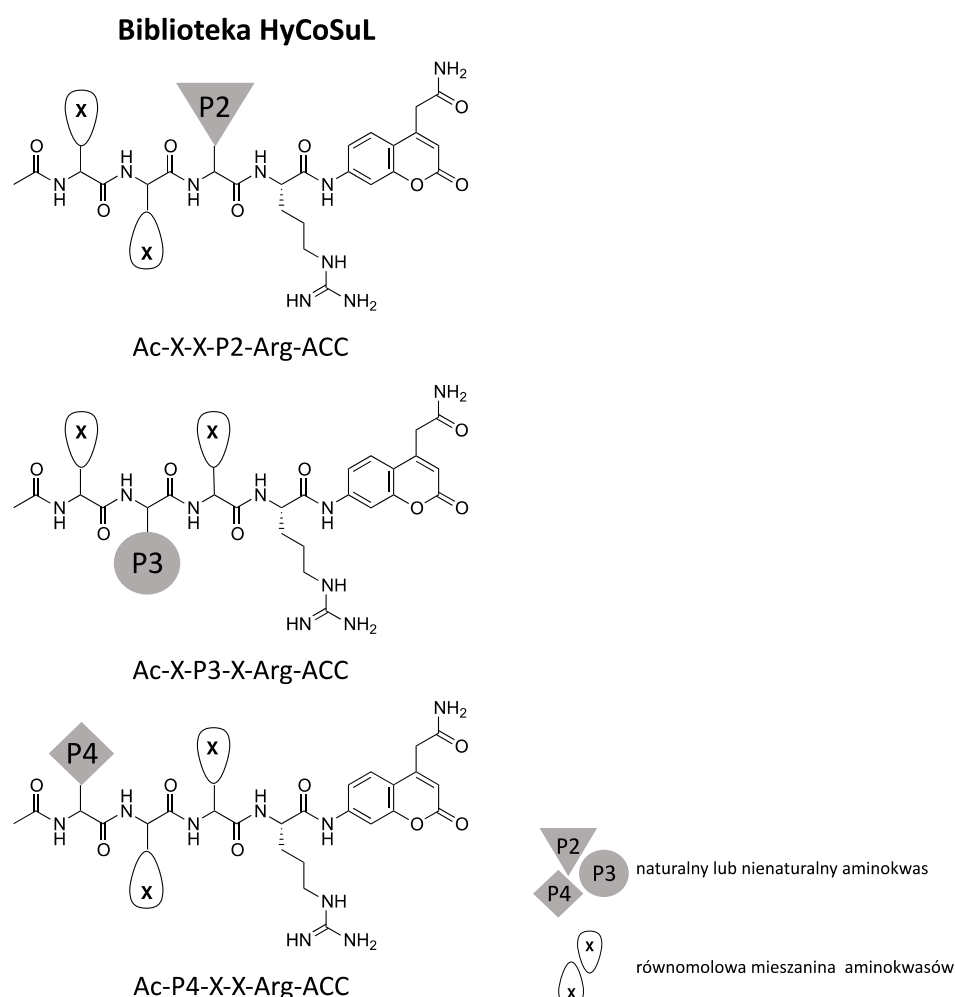
Rysunek 15. Schemat przedstawiający budowę zdefiniowanej biblioteki P1 użytej do badania preferencji katalitycznych czynników krzepnięcia w kieszeni S1.

W celu określenia specyficzności substratowej badanych proteaz w pozycji P1, użyto 96-dołkowych płytek, w których umieszczono składniki biblioteki o końcowym stężeniu 200 μM , a następnie dodano jeden z czynników: 75 nM APC, 9 nM trombiny, 21 nM czynnika Xa lub 8 nM czynnika XIa. Bibliotekę badano monitorując przyrost fluorescencji w czasie (RFU/s), a otrzymane wyniki odpowiadające aktywności enzymów względem zdefiniowanych substratów, posłużyły do wyznaczenia profilu specyficzności substratowej (Rysunek 16).

Pozycja P1. Porównanie specyficzności substratowej APC, trombiny i czynnika Xa w pozycji P1 wykazało, że wszystkie te trzy proteazy rozpoznawały jedynie dodatnio naładowaną resztę L-Arg (100%). Uwarunkowane jest to głównie budową miejsc aktywnych tych enzymów, w których to w kieszeni S1 znajduje się negatywnie naładowana reszta Asp189 ułatwiająca wiązanie pozytywnie naładowanej argininy [151, 174]. Otrzymane wyniki są także zgodne ze wcześniejszymi badaniami, w których arginina w pozycji P1 występowała we wszystkich fizjologicznych substratach APC, trombiny oraz czynnika Xa [71, 82, 167, 168].

Dotychczasowo przeprowadzone badania sugerowały, że kieszeń S1 czynnika XIa jest wysoce konserwowana i może oddziaływać wyłącznie z dodatnio naładowaną resztą L-Arg [134, 233, 234]. Kieszeń S1 czynnika XIa okazała się być jednak mniej konserwatywna niż w przypadku APC, trombiny oraz czynnika Xa. Poza najlepiej rozpoznawaną naturalną L-Arg (100%), zaobserwowano także hydrolizę pochodnej fenyloalaniny z grupą guanidynową w pozycji *para* L-Phe(guan) (22%). Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi na podstawie struktury krystalicznej kieszeni S1 czynnika XIa, gdzie pętla utworzona przez mostek solny między *N*-końcową aminą Ile370, a łańcuchem bocznym Asp554 umożliwia wiązanie grupy guanidynowej reszt aminokwasowych [134]. Dodatkowo czynnik XIa rozpoznawał takie hydrofobowe reszty jak L-Asp(Bzl), D-Phe(2-Cl), D-Phe(3-Cl), ale ze znacznie niższą wydajnością. Obserwacje te świadczą o tym, że kieszeń S1 czynnika XIa ma podwójne właściwości. Jest ujemnie naładowana, gdyż wiąże zasadowe łańcuchy boczne, ale może także pomieścić duże, hydrofobowe pochodne aminokwasowe. Czynnik XIa nie wykazuje także stereospecyficzności w kieszeni S1, ponieważ rozpoznaje L- jak i D-aminokwasy. To kolejna cecha odróżniająca czynnik XIa od APC, trombiny i czynnika Xa.

znacznik fluorescencyjny w pozycji P1' – ACC, pozwalający na monitorowanie przyrostu fluorescencji w czasie oraz acetylowany *N*-koniec. Struktura łańcuchów bocznych aminokwasów użytych do konstrukcji biblioteki obejmuje aminokwasy o różnym rozmiarze, kształcie i charakterze chemicznym co pozwala utworzyć możliwie jak najwięcej oddziaływań między kieszeniami centrum aktywnego enzymu, a substratem. Aktywność czynników krzepnięcia sprawdzono przy użyciu 100 μ M składników biblioteki oraz stężeniu enzymów równym 40 nM dla APC, 1 nM dla trombiny, 5 nM dla czynnika Xa i 8 nM dla czynnika XIa. Otrzymane wyniki posłużyły do wyznaczenia profili specyficzności substratowych poszczególnych czynników krzepnięcia. Preferencje katalityczne tych enzymów mają pomóc w rozróżnieniu ich między sobą i znalezieniu selektywnych sekwencji peptydowych (Rysunek 18, 19, 20).



Rysunek 17. Schemat przedstawiający budowę biblioteki HyCoSuL użytej do badania preferencji katalitycznych czynników krzepnięcia w kieszeniach S4-S2.

Pozycja P2. APC, trombina oraz czynnik Xa wykazywały wąską specyficzność substratową w kieszeni S2 (Rysunek 18). Każdy z tych enzymów rozpoznawał dobrze jedynie kilka naturalnych i nienaturalnych aminokwasów, a względna aktywność pozostałych nie przekroczyła 30%. Aminokwasy z ujemnie naładowanymi łańcuchami bocznymi (L-Asp, L-Glu, L-Aad) oraz reszty kwasu aminobenzoesowego (2-Abz, 3-Abz, 4-Abz) były całkowicie nierozpoznawane przez badane proteazy. Ponadto, APC, trombina jak i czynnik Xa nie wykazywały aktywności wobec D-aminokwasów, co świadczy o stereospecyficzności tej kieszeni.

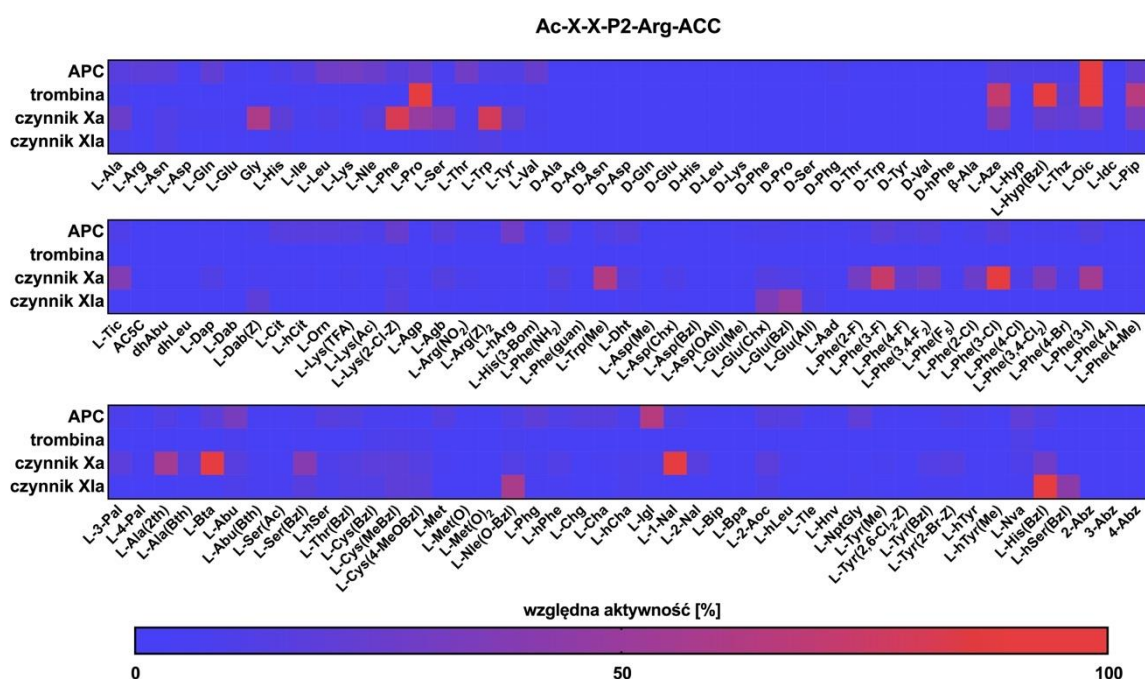
W przypadku APC z puli naturalnych aminokwasów hydrolizowane były strukturalnie różne reszty aminokwasowych, wśród których L-Lys (30%) okazała się być najbardziej preferowana. Natomiast ze wszystkich badanych struktur to nienaturalna pochodna proliny zaopatrzona w dodatkowy pierścień cykloheksanu – L-Oic (100%) była najlepiej rozpoznawana. Hydrofobowa L-2-indanyloglicyna (L-Igl, 64%) była również dobrze tolerowana w tej pozycji, a co ważniejsze, pozwoliła odróżnić APC od trombiny i czynnika Xa. Dobre dopasowanie tych dwóch nienaturalnych aminokwasów do centrum aktywnego APC może świadczyć o obecności dodatkowej przestrzeni w pobliżu kieszeni S2, zdolnej do pomieszczenia bardziej złożonych struktur niż naturalne aminokwasy.

W pozycji P2 trombina rozpoznawała mniej reszt aminokwasowych niż APC i czynnik Xa. Wynikać to może z kształtu i hydrofobowości kieszeni S2 znacznie zmniejszonej przez pętlę utworzoną przez reszty Tyr60A, Trp60D, His57 i Leu99 [177–179]. Wśród naturalnych aminokwasów zaobserwowano wyraźną preferencję względem L-Pro (93%), co potwierdza wcześniejsze badania literaturowe [71, 82, 180, 181]. Podobna preferencja względem L-Pro jest również charakterystyczna dla innych proteaz serynowych takich jak granzym A [57], katepsyna G [265], proteinaza 3 [265] czy elastaza neutrofilowa [265]. W celu uzyskania selektywności i zmniejszenia możliwości występowania krzyżowej aktywności względem innych enzymów, do optymalizacji substratów trombiny użyto dodatkowo dwóch pochodnych proliny (L-Aze, 72% i L-Pip, 65%), które były 3-krotnie lepiej rozpoznawane przez trombinę niż przez APC i czynnik Xa.

Kieszeń S2 czynnika Xa jest zdolna do wiązania różnych naturalnych aminokwasów z preferencją do hydrofobowych L-Phe (82%) i L-Trp (80%) oraz niepolarniej Gly (60%). Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi danymi przedstawionymi przez Gosalię i współpracowników [182]. Tym, co odróżniało specyficzność czynnika Xa spośród innych

badanych proteaz, była wysoka aktywność względem takich nienaturalnych aminokwasów jak 3-benzotienylo-L-alanina (L-Bta, 100%) i 3-(1-naftylo)-L-alanina (L-1-Nal, 94%) oraz pochodnych fenyloalaniny z podstawnikiem halogenkowym w pozycji *meta* L-Phe(3-F) (73%), L-Phe(3-Cl) (100%) i L-Phe(3-I) (55%).

Czynnik XIa podobnie jak APC, trombina i czynnik Xa wykazywał wąską specyficzność substratową w kieszeni S2. Względna aktywność wszystkich naturalnych aminokwasów była poniżej 15%. Kolejnym podobieństwem do badanych czynników krzepnięcia była stereospecyficzność tej kieszeni oraz ignorowanie reszt kwasu aminobenzoesowego (2-Abz, 3-Abz, 4-Abz). Dodatkowo w tej pozycji żadna z pochodnych fenyloalaniny nie była rozpoznawana. Co ciekawe, jedynymi aminokwasami, które dobrze wpasowywały się w tę kieszeń, były reszty, które w swojej strukturze posiadały grupę benzylową, takie jak ester benzylowy kwasu L-glutaminowego (L-Glu(Bzl), 48%), ester benzylowy L-norleucyny (L-Nle(O-Bzl), 58%), benzylo-L-histydyna (L-His(Bzl), 100%) i benzylo-L-homoseryna (L-hSer(Bzl), 43%). Co ważniejsze, na tej podstawie możliwe było odróżnienie czynnika XIa od APC, trombiny i czynnika Xa, które odrzucają takie pochodne.



Rysunek 18. Profile specyficzności substratowej APC, trombiny oraz czynników Xa i XIa w pozycji P2 przedstawione w postaci mapy ciepłej. Bibliotekę HyCoSuL poddano reakcji z poszczególnymi enzymami, a szybkość hydrolizy substratów mierzono jako przyrost fluorescencji w czasie (RFU/s). Uwalnianie ACC monitorowano przez 30 minut ($\lambda_{ex} = 355$ nm, $\lambda_{em} = 460$ nm). Profile specyficzności substratowej wyznaczono w analogiczny sposób jak w przypadku biblioteki P1.

Pozycja P3. Kieszeń S3 okazała się być bardziej tolerancyjna na zróżnicowanie strukturalne niż kieszeń S2 (Rysunek 19). W przypadku naturalnych aminokwasów APC, trombina i czynnik Xa wykazywały podobne preferencje substratowe. Rozszerzenie klasycznej biblioteki PS-SCL o dużą pulę nienaturalnych aminokwasów pozwoliło na szerszą eksplorację kieszeni S3, co przy poszukiwaniu selektywnych sekwencji peptydowych było konieczne. W tej pozycji D-aminokwasy były dobrze tolerowane, a z kolei prolina i jej pochodne wykazywały niewielką lub nie wykazywały żadnej aktywności.

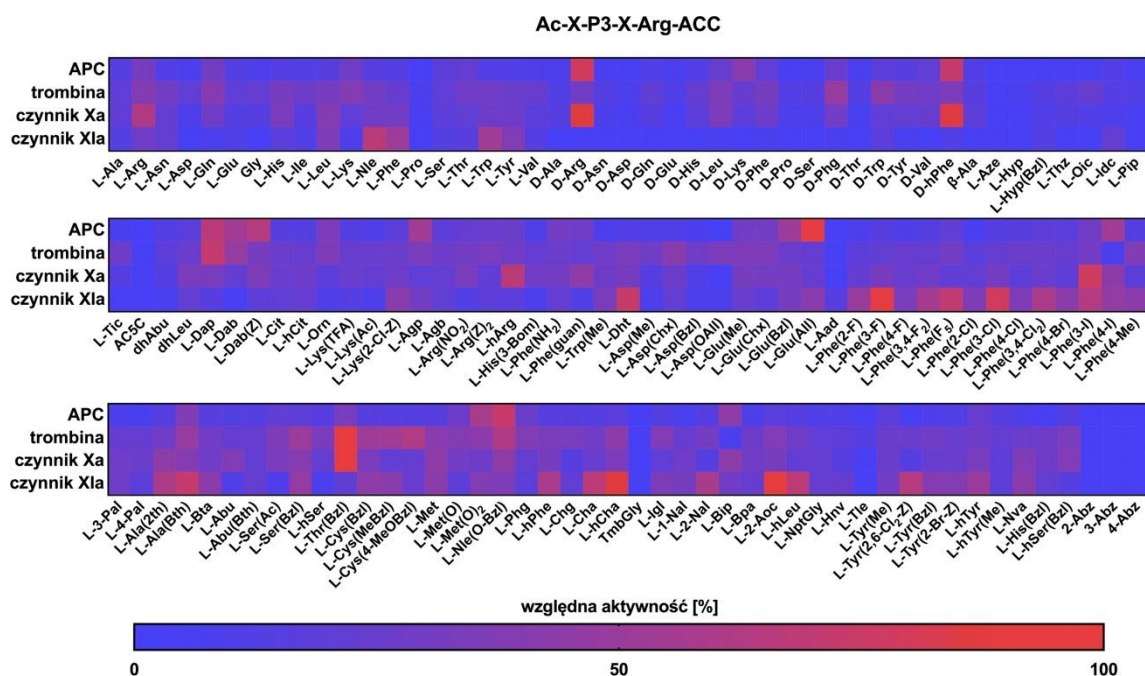
W kieszeni S3 APC z naturalnych aminokwasów preferencyjnie rozpoznawane były zasadowe reszty L-Arg (32%) i L-Lys (28%). Co ciekawe, te same aminokwasy o konformacji D były jeszcze lepiej hydrolizowane (D-Arg, 79%), (D-Lys, 41%) analogicznie jak we wcześniejszych wynikach [183]. Dodatkowo, znaczny wzrost względnej aktywności zaobserwowano również w przypadku pochodnych L-Arg i L-Lys o krótszych łańcuchach bocznych i tym samym charakterze chemicznym, takich jak L-Agp (54%) i L-Dap (67%). Duże, hydrofobowe reszty aminokwasowe z grupą benzyłową, a mianowicie L-Dab(Z) (64%), L-Glu(Bzl) (52%) oraz L-Nle(O-Bzl) (73%) były rozpoznawane przez APC nie tylko dobrze, ale i selektywnie w tej pozycji.

Trombina wykazywała szerokie preferencje dla naturalnych aminokwasów, głównie dla zasadowych L-Arg (39%) i L-Lys (39%). Hydrofobowe nienaturalne reszty z grupą benzyłową były dobrze tolerowane w tej pozycji, a spośród nich dwie pochodne cysteiny, L-Cys(MeBzl) (54%) i L-Cys(4-MeOBzl) (62%), okazały się być aktywnie i selektywnie rozpoznawane jedynie przez trombinę.

Czynnik Xa z puli naturalnych aminokwasów najlepiej rozpoznawał L-Arg (61%). Dobrze tolerowane były także takie D-aminokwasy jak D-Arg (86%) i D-hPhe (85%). Jednak struktury te były również dobrze rozpoznawane przez APC, dlatego nie mogły zostać wykorzystane do syntezy selektywnych substratów. Pochodna argininy wydłużona o jedną grupę metylenową (L-hArg, 67%) okazała się być bardziej aktywna niż jej krótsze analogi (L-Agb, 23%, L-Agp, 20%), a preferencja ta odróżniała czynnik Xa od APC i trombiny.

Profil specyficzności substratowej czynnika XIa w pozycji P3 znacząco różnił się od profili APC, trombiny i czynnika Xa. Dobrze rozpoznawanymi naturalnymi aminokwasami były duże aromatyczne L-Phe (52%), L-Trp (54%) i L-Tyr (37%).

Preferowane były również alifatyczne reszty takie jak L-Leu (36%) i L-Nle (67%). Nienaturalny kwas L-2-aminooktanowy (L-2-Aoc, 100%) oraz L-dehydrotryptofan (L-Dht, 74%) wykazywały się wysoką selektywnością i aktywnością względem czynnika XIa. Dodatkowo aminokwasy z wydłużonym łańcuchem bocznym wykazywały zwiększoną aktywność i selektywność, jak w przypadku L-homoleucyny (L-hLeu, 68%), L-homofenyloalaniny (L-hPhe, 58%) i L-homocykloheksyloalaniny (L-hCha, 86%). Ponadto, pochodne fenyloalaniny z podstawnikiem halogenkowym w pozycji *meta*, L-Phe(3-F) (90%) i L-Phe(3-Cl) (79%), posiadały jedną z najwyższych względnych aktywności w przypadku czynnika XIa, będąc jednocześnie słabo rozpoznawane przez inne czynniki krzepnięcia.



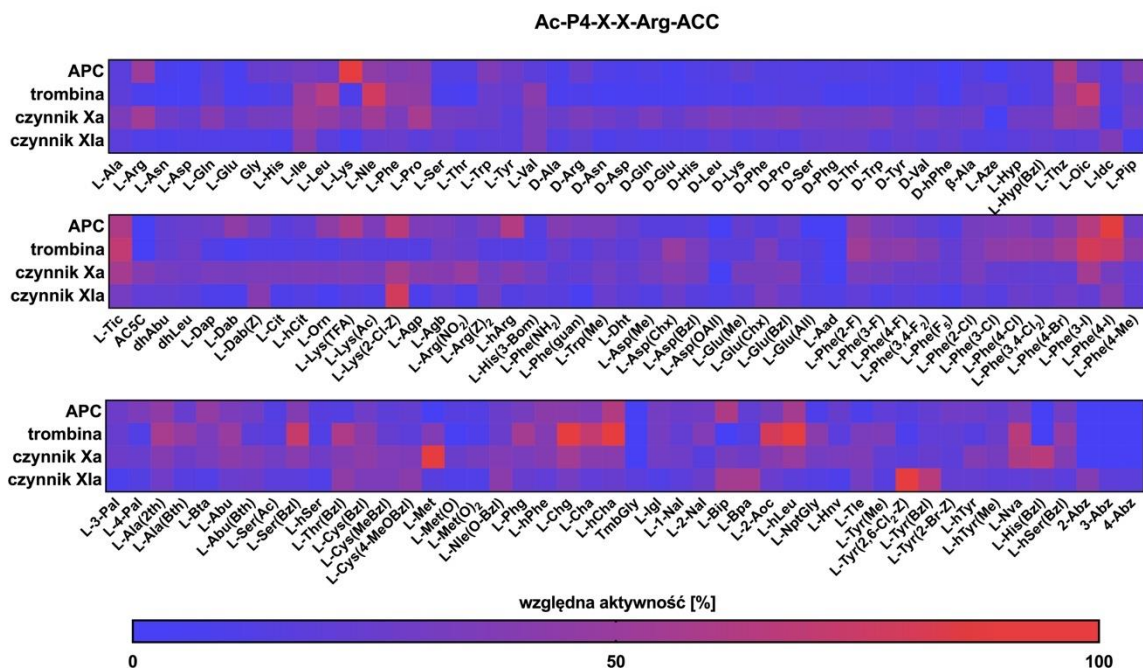
Rysunek 19. Profile specyficzności substratowej APC, trombiny oraz czynników Xa i XIa w pozycji P3 przedstawione w postaci mapy cieplnej. Bibliotekę HyCoSuL poddano reakcji z poszczególnymi enzymami, a szybkość hydrolizy substratów mierzono jako przyrost fluorescencji w czasie (RFU/s). Uwalnianie ACC monitorowano przez 30 minut ($\lambda_{ex} = 355$ nm, $\lambda_{em} = 460$ nm). Profile specyficzności substratowej wyznaczono w analogiczny sposób jak w przypadku biblioteki P1.

Pozycja P4. Najbardziej preferowanymi naturalnymi aminokwasami w przypadku APC były długie i zasadowe L-Arg (51%) oraz L-Lys (100%) (Rysunek 20). Negatywnie naładowane reszty i D-aminokwasy były w większości odrzucane w tej pozycji. Z puli nienaturalnych aminokwasów pochodne lizyny i argininy L-Lys(TFA) (60%), L-Lys(2-Cl-Z) (67%) i L-hArg (63%) dobrze wpasowywały się w tę kieszeń. Rozpoznawana była również pochodna fenyloalaniny z jodem w pozycji *para*, L-Phe(4-I) (89%).

W przeciwieństwie do APC, trombina nie rozpoznawała L-Arg i L-Lys, ale była zdolna do wiązania rozgałęzionych aminokwasów alifatycznych, takich jak L-Ile (49%), L-Leu (65%) i L-Val (42%), co jest zgodne z danymi uzyskanymi przez grupę Craika [82] i Hellmana [170]. Dość dobrze tolerowane były także nienaturalne pochodne fenyloalaniny, jednak rozpoznawane były również przez APC. Dodatkowo, wydłużenie łańcucha bocznego poprawiło dopasowanie do miejsca aktywnego takich reszt aminokwasowych jak L-2-Aoc (80%), L-hLeu (98%) i L-hCha (94%).

Analiza pozycji P4 pokazała, że czynnik Xa nie wykazuje prawie żadnej stereospecyficzności w kieszeni S4, ponieważ rozpoznaje naturalne reszty aminokwasowe, jak i te o konformacji D na bardzo podobnym poziomie. Najbardziej preferowanym aminokwasem była L-Met (100%), jednak to D-Pro (39%) i L-His(Bzl) (66%) były resztami rozpoznawanymi wyłącznie przez czynnik Xa, a więc mogącymi znaleźć dalsze zastosowanie w projektowaniu selektywnych narzędzi chemicznych dla tego enzymu.

Kieszeń S4 czynnika XIa posiada szeroką specyficzność substratową, jednak nie w przypadku naturalnych aminokwasów. Tutaj czynnik XIa dość dobrze rozpoznawał jedynie rozgałęzione reszty alifatyczne, takie jak L-Ile (43%) i L-Val (35%). Wśród wszystkich przebadanych aminokwasów, kieszeń ta preferencyjnie rozpoznawała duże reszty aminokwasowe z grupą benzyłową, a mianowicie L-Dab(Z) (40%), L-Lys(2-Cl-Z) (79%), L-Thr(Bzl) (45%) i L-Tyr(Bzl) (66%). Najlepsza pod względem aktywności i selektywności okazała się być pochodna tyrozyny L-Tyr(2,6-Cl₂-Z) (100%) dobrze rozpoznawana wyłącznie przez czynnik XIa. Co ciekawe, jedynie czynnik XIa ze wszystkich badanych proteaz tolerował reszty kwasu aminobenzoowego w tej pozycji, co było kolejną cechą odróżniającą go od innych enzymów z kaskady krzepnięcia krwi.

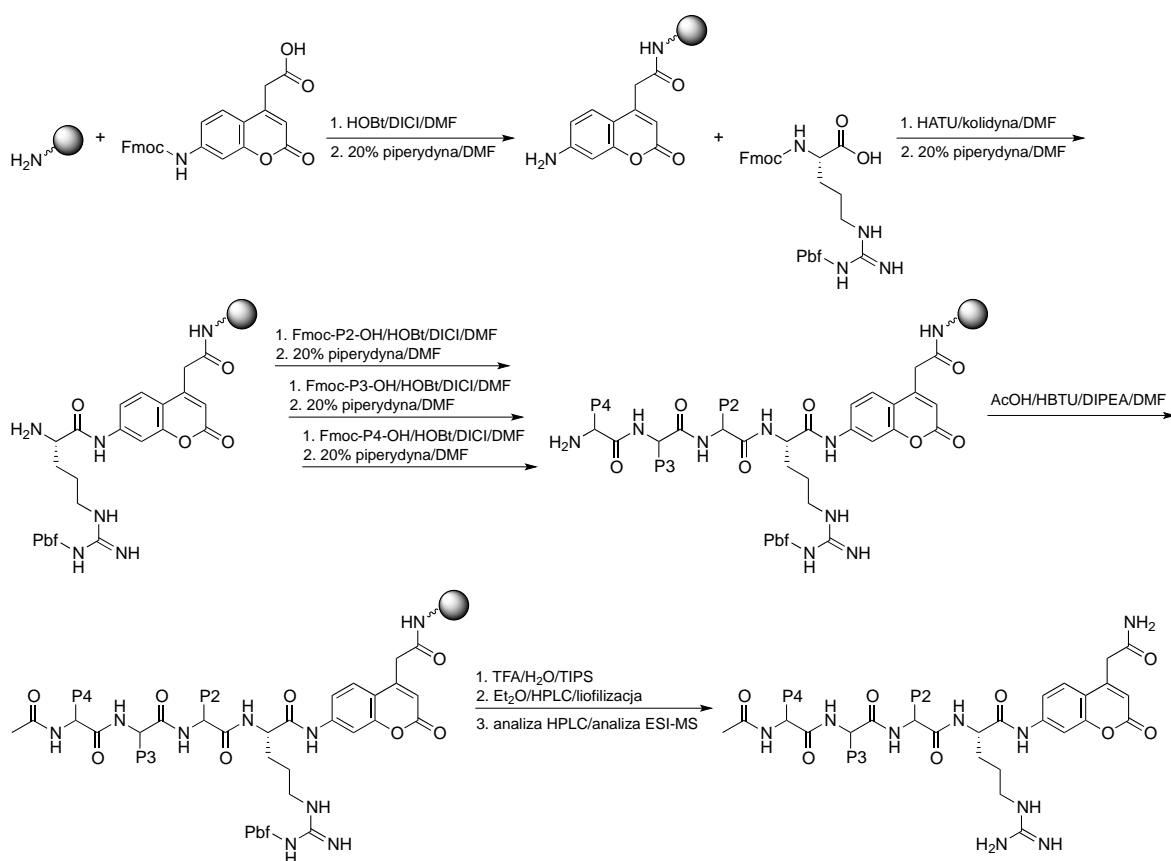


Rysunek 20. Profile specyficzności substratowej APC, trombiny oraz czynników Xa i XIa w pozycji P4 przedstawione w postaci mapy cieplnej. Bibliotekę HyCoSuL poddano reakcji z poszczególnymi enzymami, a szybkość hydrolizy substratów mierzono jako przyrost fluorescencji w czasie (RFU/s). Uwalnianie ACC monitorowano przez 30 minut ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Profile specyficzności substratowej wyznaczono w analogiczny sposób jak w przypadku biblioteki P1.

3.2. Projektowanie, synteza i analiza kinetyczna tetrapeptydowych substratów dla proteaz serynowych uczestniczących w ścieżce koagulacyjnej

Do tej pory w literaturze opisano kilka tetrapeptydowych fluorogenicznych substratów do badania aktywności czynników krzepnięcia, głównie dla trombiny i czynnika Xa [82, 182]. W swojej strukturze substraty te zawierają jednak tylko naturalne aminokwasy przez co nie posiadają odpowiedniej selektywności i nie mogą być wykorzystane do monitorowania aktywności poszczególnych enzymów w złożonym układzie biologicznym. Dlatego w tej części badań na podstawie uzyskanych wyżej profili specyficzności w pozycjach P4-P1 dla każdej proteazy wyselekcjonowano naturalne i nienaturalne reszty aminokwasowe preferowane tylko przez ten enzym. Następnie w oparciu o różne kombinacje wybranych reszt (P4-P1) zaprojektowano tetrapeptydowe substraty z zablokowaną grupą acetylową *N*-końcem oraz znacznikiem fluorescencyjnym ACC w pozycji P1'. Wszystkie substraty zsyntetyzowano na podłożu stałym przy użyciu żywicy amidowej oraz wykorzystując strategię Fmoc do wydłużania łańcucha peptydowego (Rysunek 21). W pierwszym etapie do żywicy typu Rink Amide RA przyłączono znacznik

fluorogeniczny ACC, a następnie L-Arg. Tak przygotowaną żywicę podzielono na porcje i przyłączono kolejne reszty aminokwasowe w kolejności P2, P3 i P4. Każdy substrat następnie zacetylowano, odłączono od żywicy, wytrącono i oczyszczono przy użyciu półpreparatywnego HPLC. Czystość substratów potwierdzono za pomocą analitycznego HPLC, a masę cząsteczkową poprzez analizę ESI-MS. Związki następnie zliofilizowano i rozpuszczono w DMSO do końcowego stężenia równego 10 mM.



Rysunek 21. Schemat przedstawiający syntezę tetrapeptydowych substratów do badania czynników krzepnięcia krwi. Substraty zsyntetyzowano na podłożu stałym z wykorzystaniem strategii Fmoc.

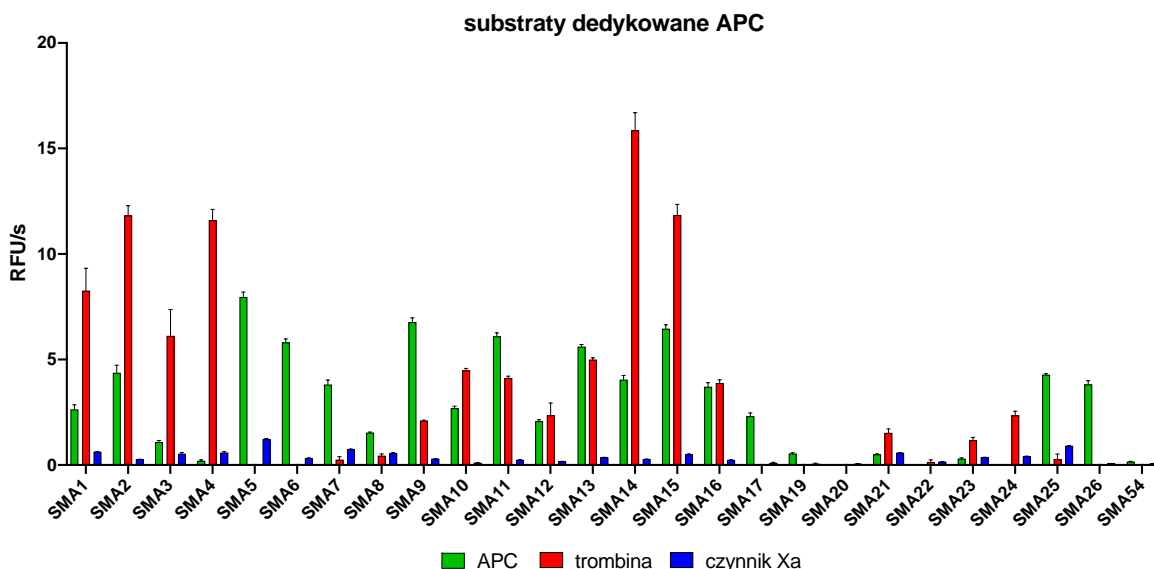
W miejscu aktywnym wielu proteaz występuje tzw. efekt kooperatywności kieszeni polegający na oddziaływaniu sąsiadujących ze sobą kieszeni oraz zmianie ich specyficzności substratowej w zależności od związanych w nich reszt aminokwasowych [266]. Zjawisko to należy brać pod uwagę przy projektowaniu nowych substratów peptydowych, dlatego w kolejnym kroku dokonano walidacji otrzymanych wcześniej profili specyficzności substratowej (Rysunek 22, 23, 24, 25). W tym celu każdy z substratów o końcowym stężeniu 1 μM umieszczono na płytce 96-dołkowej i dodano odpowiednią proteazę. Końcowe stężenie każdego enzymu dobierano indywidualnie dla każdej grupy substratów i mieściło się ono w zakresie 50-120 nM dla APC, 0,15-35 nM dla trombiny, 7-100 nM dla czynnika Xa i 5 nM dla czynnika XIa. Otrzymane wartości RFU/s przyrównano następnie do wartości odpowiadającej tej samej aktywności enzymu. Dla najbardziej obiecujących substratów przeprowadzono szczegółową analizę kinetyczną (k_{kat} , K_M , k_{kat}/K_M) przy użyciu modelu Michaelisa-Menten [267] (Tabela 5, 6). Pomiar prowadzono w zakresie stężeń substratów od 1,16 nM do 741 μM , w zależności od użytego substratu. Następnie dodano odpowiedni enzym w zakresie stężeń 2,19-425 nM dla APC, 0,07-346 nM dla trombiny, 2,80-224 nM dla czynnika Xa oraz 5 nM dla czynnika XIa. Selektyność substratów dedykowanych APC, trombinie i czynnikowi Xa sprawdzano względem tych trzech enzymów ze względu na fakt, iż należą one do tej samej rodziny czynników krzepnięcia zależnych od witaminy K [15, 16, 82, 151]. Substraty dedykowane czynnikowi XIa badano względem czynnika XIa, ale też innych czynników krzepnięcia (APC, trombina, czynnik Xa) mając na uwadze wykorzystanie tych struktur do badania obecności i aktywności czynnika XIa w złożonych próbkach biologicznych zawierających wszystkie te enzymy.

3.2.1. Substraty dedykowane APC

Dla APC zaprojektowano i zsyntetyzowano dwadzieścia pięć fluorogenicznych substratów tetrapeptydowych (SMA1-SMA26) zawierających najbardziej selektywne naturalne i nienaturalne reszty aminokwasowe. Substraty te w pozycji P1 posiadały resztę L-Arg. W pozycji P2 wybrano hydrofobowe: L-Lys(2-Cl-Z), L-Igl, L-Val, L-Oic i L-Cha, a także dodatnio naładowaną L-Lys. W pozycji P3 znajdowały się reszty aminokwasowe z grupą benzyłową (L-Dab(Z), L-Glu(Bzl), L-Nle(O-Bzl)) oraz dobrze tolerowane pochodne argininy i kwasu glutaminowego (L-Agp, L-Glu(All)), a w pozycji P4 L-Lys. Dodatkowo zsyntetyzowano także jeden substrat zawierający w swojej sekwencji tylko naturalne

aminokwasy (SMA54), w celu porównania jego aktywności względem substratów zawierających nienaturalne aminokwasy.

Przesiewowe badania kinetyczne wykazały (Rysunek 22), że sekwencje z L-Igl (SMA5-SMA8), L-Val (SMA9-SMA12) i L-Oic (SMA13-SMA16) w pozycji P2 były lepiej hydrolizowane przez APC niż te z L-Lys(2-Cl-Z) (SMA1-SMA4), L-Lys (SMA17-SMA20) i L-Cha (SMA21-SMA24). Potwierdza to otrzymany wcześniej profil specyficzności substratowej w pozycji P2 uzyskany metodą HyCoSuL. Pozycja P2 miała również kluczowe znaczenie w odróżnianiu APC od trombiny i czynnika Xa, ponieważ L-Igl i L-Lys były najbardziej selektywnymi aminokwasami dla APC, słabo rozpoznawanymi przez inne czynniki krzepnięcia. Co więcej, zamiana długiej reszty L-Nle(O-Bzl) (SMA4) w pozycji P3 na krótsze reszty L-Dab(Z) (SMA1), L-Agp (SMA2) i L-Glu(Bzl) (SMA3) spowodowała znaczący wzrost aktywności APC (odpowiednio 13-, 22- i 5,5-krotny). Najlepszy substrat zawierający nienaturalne aminokwasy (SMA5) był około 50-krotnie wydajniej hydrolizowany niż naturalny substrat (SMA54), co sugeruje, że to właśnie zastosowanie metody HyCoSuL pozwoliło na uzyskanie selektywnych substratów, względem których APC wykazywało dużą aktywność. Aby zminimalizować potencjalną aktywność krzyżową z innymi czynnikami krzepnięcia, przeprowadzono szczegółową analizę kinetyczną czterech selektywnych substratów APC, która wykazała, że najlepszy substrat, SMA5 (Ac-Lys-Dab(Z)-Igl-Arg-ACC, $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 71000 \pm 2000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) był również rozpoznawany przez trombinę ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 1800 \pm 80 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) i czynnik Xa ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 4000 \pm 150 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), co wyklucza go z dalszych badań (Tabela 5). SMA5 jest jednak najlepszym pod względem aktywności substratem dedykowanym APC z dotychczasowo opisanych w literaturze. Znalaziono kilka selektywnych substratów, wśród których SMA17 (Ac-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg-ACC, $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 10000 \pm 600 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) posiadał bardzo wysoki współczynnik selektywności $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ i znikomą hydrolizę podczas badań z innymi czynnikami krzepnięcia.



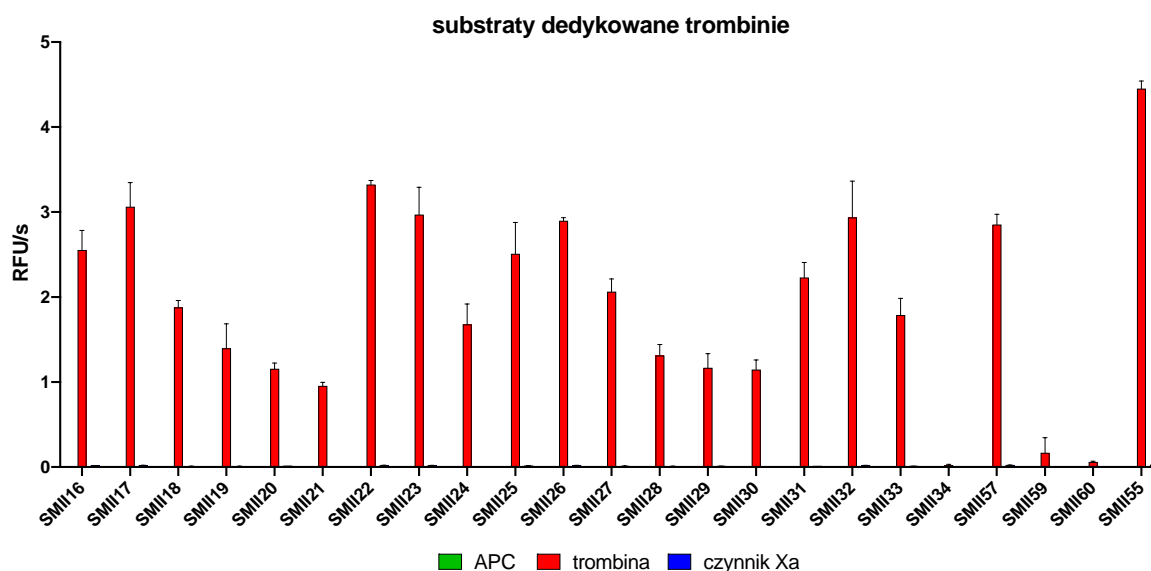
Rysunek 22. Wyniki przesiewowych badań kinetycznych substratów dedykowanych APC. Szybkość hydrolizy substratów (RFU/s) mierzono przez 30 minut ($\lambda_{ex} = 355$ nm, $\lambda_{em} = 460$ nm). Dane przedstawione są jako wartości średnie \pm s.d.; $n = 3$, gdzie n oznacza liczbę niezależnych eksperymentów. Sekwencje substratów przedstawiono w części eksperymentalnej (Tabela 9).

3.2.2. Substraty dedykowane trombinie

Dla trombiny zaprojektowano dwadzieścia dwa optymalne substraty fluorogeniczne z naturalnymi i nienaturalnymi resztami aminokwasowymi (SMII16-SMII60) oraz jeden substrat głównie naturalny (SMII55). W zsyntetyzowanych nienaturalnych sekwencjach L-Arg znajdowała się w pozycji P1, pochodne proliny w pozycji P2 (L-Pro, L-Aze, L-Pip, L-Hyp(Bzl)), analogi cysteiny w pozycji P3 (L-Cys(MeBzl), L-Cys(4-MeOBzl)), oraz alifatyczne łańcuchy boczne w pozycji P4 (L-hCha, L-hLeu, L-2-Aoc, L-Chg).

Przesiewowe badania kinetyczne pokazały (Rysunek 23), że zamiana tylko jednego aminokwasu w pozycji P2, krótszych L-Pro (SMII25), L-Aze (SMII28) lub L-Pip (SMII31) na dłuższą i większą resztę L-Hyp(Bzl) (SMII34), spowodowała znaczący spadek aktywności enzymu o ponad 99%. Wynik ten sugeruje, że kieszeń S2 jest mała i ma istotne znaczenie w interakcji z substratami, co jest zgodne z wcześniejszymi danymi literaturowymi dla trombiny [181]. Preferencja kieszeni S4 względem szerokich L-hCha (SMII22), L-hLeu (SMII23), L-Chg (SMII57), bardziej niż względem długiej reszty L-2-Aoc (SMII24), uzyskana we wstępnych pomiarach kinetycznych, bardzo dobrze odzwierciedla profil specyficzności uzyskany na podstawie HyCoSuL. Szczegółowa analiza kinetyczna obiecujących substratów (SMII22, SMII32, SMII55) ujawniła, że najaktywniej

hydrolizowany substrat trombiny, SMII22 (Ac-hCha-Cys(MeBzl)-Pip-Arg-ACC, $k_{\text{kat}}/K_M = 8660000 \pm 260000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) był słabo rozpoznawany przez APC i czynnik Xa, z odpowiednio 3383- i 162-krotną selektywnością względem trombiny (Tabela 5). Głównie naturalny substrat SMII55 (Ac-Nle-Lys-Pro-Arg-ACC) wykazywał najniższy stosunek selektywności k_{kat}/K_M spośród wszystkich badanych substratów, co wyeliminowało go z dalszych badań.



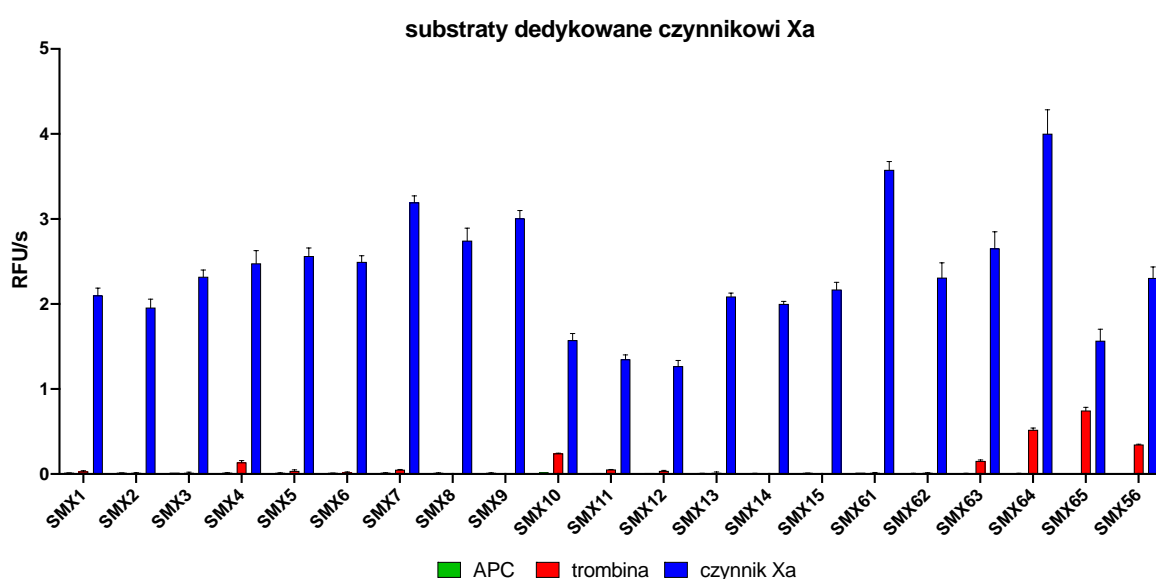
Rysunek 23. Wyniki przesiewowych badań kinetycznych substratów dedykowanych trombinie. Szybkość hydrolizy substratów (RFU/s) mierzono przez 30 minut ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Dane przedstawione są jako wartości średnie \pm s.d.; $n = 3$, gdzie n oznacza liczbę niezależnych eksperymentów. Sekwencje substratów przedstawiono w części eksperymentalnej (Tabela 10).

3.2.3. Substraty dedykowane czynnikowi Xa

W oparciu o uzyskany profil specyficzności substratowej zaprojektowano i zsyntetyzowano dwadzieścia indywidualnych substratów fluorogenicznych z nienaturalnymi aminokwasami dedykowanych czynnikowi Xa (SMX1-SMX65) oraz jedną naturalną sekwencję (SMX56). W nienaturalnych substratach L-Arg wybrano w pozycji P1. W pozycji P2 znajdowały się takie reszty aminokwasowe jak: L-Trp, L-Phe(3-Cl), L-Bta, L-Phe, L-1-Nal lub Gly. Pozycja P3 została zajęta przez L-hArg, a w pozycji P4 wybrano L-Arg(NO₂), L-Gln, D-Pro, L-Met oraz L-His(Bzl).

Po wstępnych badaniach kinetycznych zauważono, że spośród substratów dedykowanych czynnikowi Xa najlepiej rozpoznawane były te zawierające L-Bta w pozycji P2 (SMX7-SMX9) (Rysunek 24). Zamiana tego nienaturalnego aminokwasu na naturalną L-Phe spowodowała 1,5-krotne zmniejszenie aktywności enzymu względem takich

substratów (SMX10-SMX12). Zauważono również, że zastąpienie D-Pro (SMX15) w pozycji P4 resztą L-Arg(NO₂) (SMX13) lub L-Gln (SMX14), spowodowało tylko niewielki spadek ogólnej aktywności czynnika Xa. Jednak zamiana D-Pro (SMX15, $k_{\text{kat}}/K_M = 143000 \pm 6500 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) na L-Met (SMX61, $k_{\text{kat}}/K_M = 221000 \pm 12000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) zwiększyła wartość stałej katalitycznej k_{kat}/K_M aż o 55% (Tabela 5). Ponadto okazało się, że to kieszenie S2 i S4 odgrywają kluczową rolę w odróżnieniu czynnika Xa od trombiny, ponieważ najbardziej selektywny substrat SMX15 (Ac-DPro-hArg-1-Nal-Arg-ACC) był 358-krotnie lepiej hydrolizowany przez czynnik Xa niż przez trombinę. Na tej podstawie wytypowano sekwencję substratu SMX15 jako wiodącą do syntezy inhibitora i markera chemicznego.



Rysunek 24. Wyniki przesiewowych badań kinetycznych substratów dedykowanych czynnikowi Xa. Szybkość hydrolizy substratów (RFU/s) mierzono przez 30 minut ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Dane przedstawione są jako wartości średnie \pm s.d.; $n = 3$, gdzie n oznacza liczbę niezależnych eksperymentów. Sekwencje substratów przedstawiono w części eksperymentalnej (Tabela 11).

Tabela 5. Parametry kinetyczne (k_{kat}/K_M) najbardziej selektywnych substratów APC, trombiny i czynnika Xa względem tych czynników krzepnięcia. Dane przedstawiają wartości średnie \pm s.d.; $n = 3$, gdzie n oznacza liczbę niezależnych eksperymentów.

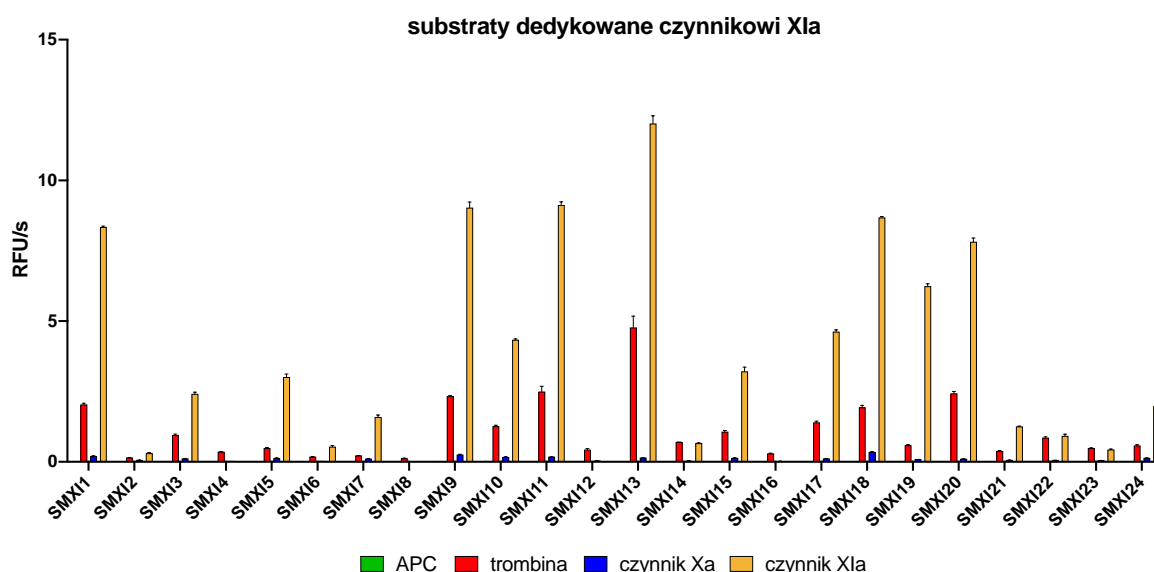
substrat	k_{kat}/K_M [$M^{-1}s^{-1}$]		
	APC	trombina	czynnik Xa
SMA5 Ac-Lys-Dab(Z)-Igl-Arg-ACC	71000 \pm 2000	1800 \pm 80	4000 \pm 150
SMA6 Ac-Lys-Agp-Igl-Arg-ACC	40000 \pm 1600	180 \pm 7	1300 \pm 90
SMA17 Ac-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg-ACC	10000 \pm 600	130 \pm 8	190 \pm 6
SMA26 Ac-Lys- β hLys-Igl-Arg-ACC	15500 \pm 800	60 \pm 2	380 \pm 13
SMII22 Ac-hCha-Cys(MeBzl)-Pip-Arg-ACC	2560 \pm 180	8660000 \pm 260000	53400 \pm 3900
SMII32 Ac-hLeu-Cys(4-MeOBzl)-Pip-Arg-ACC	1840 \pm 70	7660000 \pm 230000	64000 \pm 5800
SMII55 Ac-Nle-Lys-Pro-Arg-ACC	3160 \pm 80	6680000 \pm 460000	55500 \pm 500
SMX8 Ac-Gln-hArg-Bta-Arg-ACC	520 \pm 10	800 \pm 80	182000 \pm 13000
SMX9 Ac-DPro-hArg-Bta-Arg-ACC	560 \pm 20	750 \pm 50	217000 \pm 15000
SMX15 Ac-DPro-hArg-1-Nal-Arg-ACC	590 \pm 10	400 \pm 20	143000 \pm 6500
SMX61 Ac-Met-hArg-1-Nal-Arg-ACC	720 \pm 40	1450 \pm 70	221000 \pm 12000

3.2.4. Substraty dedykowane czynnikowi XIa

Dla czynnika XIa zsyntetyzowano dwadzieścia trzy nienaturalne, potencjalnie najlepsze substraty fluorogeniczne (SMXI1-SMXI23) oraz jeden substrat (SMXI24) zawierający w swojej sekwencji wyłącznie naturalne reszty aminokwasowe. Substraty w swojej strukturze posiadały zasadową L-Arg w pozycji P1. W pozycji P2 występowały aminokwasy z grupą benzyłową (L-His(Bzl), L-Glu(Bzl), L-Nle(*O*-Bzl), L-hSer(Bzl)). Pozycja P3 zajęta była przez alifatyczne L-Nle, L-2-Aoc, L-Cha, L-hCha, oraz duże L-Phe(3-F), L-Tyr(2,6-Cl₂-Z), L-Dht. W pozycji P4 wbudowano pochodne tyrozyny i lizyny (L-Tyr(2,6-Cl₂-Z), L-Tyr(Bzl), L-Bpa, L-Lys(2-Cl-Z)).

Wstępne badania kinetyczne wykazały (Rysunek 25), że zamiana tylko jednego aminokwasu w pozycji P2, L-His(Bzl) (SMXI3) na L-Glu(Bzl) (SMXI7), L-Nle(*O*-Bzl) (SMXI22) lub L-hSer(Bzl) (SMXI23), jest odpowiedzialna za znaczący spadek aktywności enzymu (odpowiednio 1,5-, 2,6- i 5,5-krotny). Wyniki te są zgodne z danymi HyCoSuL, gdzie L-His(Bzl) była najaktywniej rozpoznawaną resztą aminokwasową. Co zaskakujące, zauważono, że preferencja względem dłuższych, alifatycznych reszt aminokwasowych w kieszeni S3 w porównaniu do ich krótszych analogów nie potwierdziła się w badaniach

kinetycznych. Analiza substratów wykazała, że to jednak sekwencje z L-Nle (SMXI1) lub L-Cha (SMXI20) w pozycji P3 są wydajniej hydrolizowane niż te z L-2-Aoc (SMXI3) lub L-hCha (SMXI21), z nawet 6-krotnym wzrostem całkowitej aktywności czynnika XIa. Wyniki te świadczą o tym, że kieszeń S3 jest niewielka i odgrywa ważną rolę w interakcjach z substratami. Dodatkowo, tetrapeptydy z pochodnymi fenyloalaniny lub tyrozyny z podstawnikami halogenkowymi w pozycji P3 wykazywały niewielką lub nie wykazywały żadnej aktywności, chociaż skany bibliotek sugerowały, że te aminokwasy są nawet lepiej rozpoznawane niż norleucyna. Jest to prawdopodobnie spowodowane kooperatywnością kieszeni, którą zawsze należy brać pod uwagę przy stosowaniu metody HyCoSuL. Co więcej, w pozycji P4 L-Tyr(Bzl) (SMXI13) była lepiej rozpoznawana przez czynnik XIa niż L-Tyr(2,6-Cl₂-Z) (SMXI5) (4-krotnie), jednak to reszta L-Tyr(2,6-Cl₂-Z) wykazywała znaczącą selektywność względem czynnika XIa, zmniejszając aktywność krzyżową innych czynników krzepnięcia. Na podstawie wstępnych badań kinetycznych wyselekcjonowano dwie najlepsze sekwencje: SMXI5 (Ac-Tyr(2,6-Cl₂-Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg-ACC), SMXI19 (Ac-Tyr(2,6-Cl₂-Z)-Dht-His(Bzl)-Arg-ACC) i szczegółowo zbadano ich kinetykę (Tabela 6). Parametry katalityczne uzyskane dla wszystkich badanych proteaz wykazały, że substrat SMXI19 był wysoce selektywny względem czynnika XIa ($k_{kat}/K_M = 247000 \pm 5000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) oraz 28 i 80 razy lepiej hydrolizowany przez czynnik XIa niż odpowiednio przez trombinę ($k_{kat}/K_M = 8800 \pm 200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) i czynnik Xa ($k_{kat}/K_M = 3100 \pm 100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Ponadto, SMXI19 wykazywał bardzo wysoki współczynnik selektywności k_{kat}/K_M i prawie niewykrywalną hydrolizę podczas badania z APC ($k_{kat}/K_M = 91 \pm 3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). SMXI5 był również słabo rozpoznawany przez APC, trombinę i czynnik Xa, co czyni obie te struktury pierwszymi opisanymi selektywnymi substratami dla czynnika XIa, które można przekształcić w inhibitory i markery chemiczne.



Rysunek 25. Wyniki przesiewowych badań kinetycznych substratów dedykowanych czynnikowi XIa. Szybkość hydrolyzy substratów (RFU/s) mierzono przez 30 minut ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Dane przedstawione są jako wartości średnie \pm s.d.; $n = 3$, gdzie n oznacza liczbę niezależnych eksperymentów. Sekwencje substratów przedstawiono w części eksperymentalnej (Tabela 12).

Tabela 6. Parametry kinetyczne ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$) najbardziej selektywnych substratów czynnika XIa względem APC, trombiny, czynnika Xa i czynnika XIa. Dane przedstawiają wartości średnie \pm s.d.; $n = 3$, gdzie n oznacza liczbę niezależnych eksperymentów.

substrat	$k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$			
	APC	trombina	czynnik Xa	czynnik XIa
SMXI5 Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg-ACC	NW	11000 \pm 300	4500 \pm 300	99000 \pm 7000
SMXI19 Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Dht-His(Bzl)-Arg-ACC	91 \pm 3	8800 \pm 200	3100 \pm 100	247000 \pm 5000

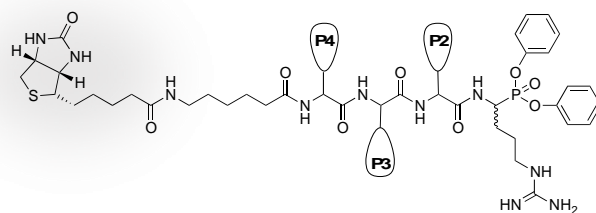
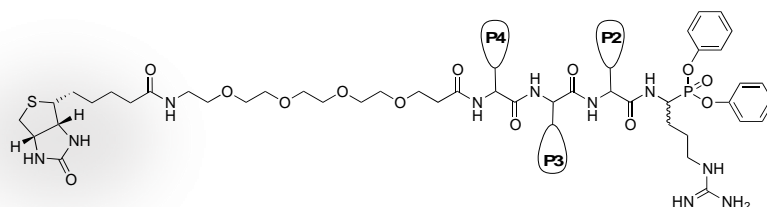
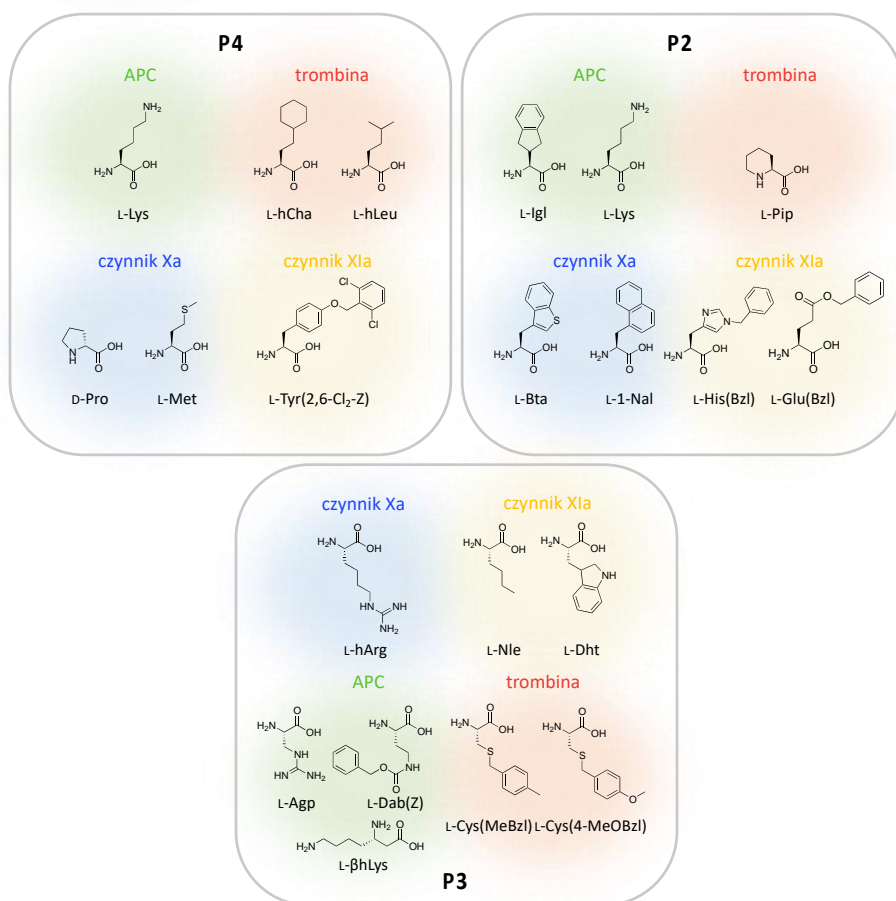
(NW) nie wyznaczono ze względu na niską aktywność enzymu względem substratu

3.3. Biotynylowane markery chemiczne

3.3.1. Projektowanie biotynylowanych markerów chemicznych

Jak dotąd, badania biologiczne nad czynnikami krzepnięcia opierały się głównie na technikach wykorzystujących przeciwciała, które uniemożliwiają rozróżnienie aktywnej formy enzymu od nieaktywnej. W kontekście badań nad rolą proteaz, może to zaburzać interpretacje wyników, ponieważ to aktywna forma tych enzymów definiuje ich funkcje biologiczne. Naprzeciw tym ograniczeniom wychodzą niskocząsteczkowe markery chemiczne (ang. *activity-based probes*, ABPs), które wiążą się jedynie do aktywnej formy enzymu i zostały już wcześniej z powodzeniem wykorzystane do selektywnego znakowania aktywnych proteaz w złożonych próbkach [90, 91, 268, 269].

Na podstawie otrzymanych wcześniej selektywnych sekwencji peptydowych dla APC, trombiny, czynnika Xa i XIa w kolejnej części badań zaprojektowano, zsyntetyzowano i scharakteryzowano serię dziesięciu markerów chemicznych pierwszej generacji umożliwiających wizualizację aktywnych enzymów w próbkach biologicznych poprzez analizę SDS-PAGE, a następnie za pomocą techniki Western blot. Zaprojektowane markery składały się z czterech kluczowych elementów (Rysunek 26A). Pierwszym z nich była reaktywna grupa wiążąca (ang. *warhead*) – fosfonian difenyłu, tworząca wiązanie kowalencyjne z resztą seryny w miejscu aktywnym proteaz serynowych [60]. Kolejnym elementem był selektywny fragment peptydowy zaprojektowany dla każdego enzymu indywidualnie, warunkujący jego rozpoznanie (Rysunek 26B). W skład markerów chemicznych pierwszej generacji wchodziła także biotyna, która jako znacznik umożliwiła detekcję docelowego białka. Czwarty element – linker zastosowano w celu oddzielenia sekwencji peptydowej od znacznika i zmniejszenia możliwości powstawania zawady sterycznej w miejscu aktywnym enzymu. Jako linker w markerach zaprojektowanych dla APC, trombiny i czynnika Xa zastosowano kwas 6-aminoheksanowy (6-Ahx). ABPs dedykowane czynnikowi XIa zaopatrzone z kolei zostały w glikol polietylenowy (PEG(4)), który dodatkowo jeszcze poprawił hydrofilowość projektowanych struktur.

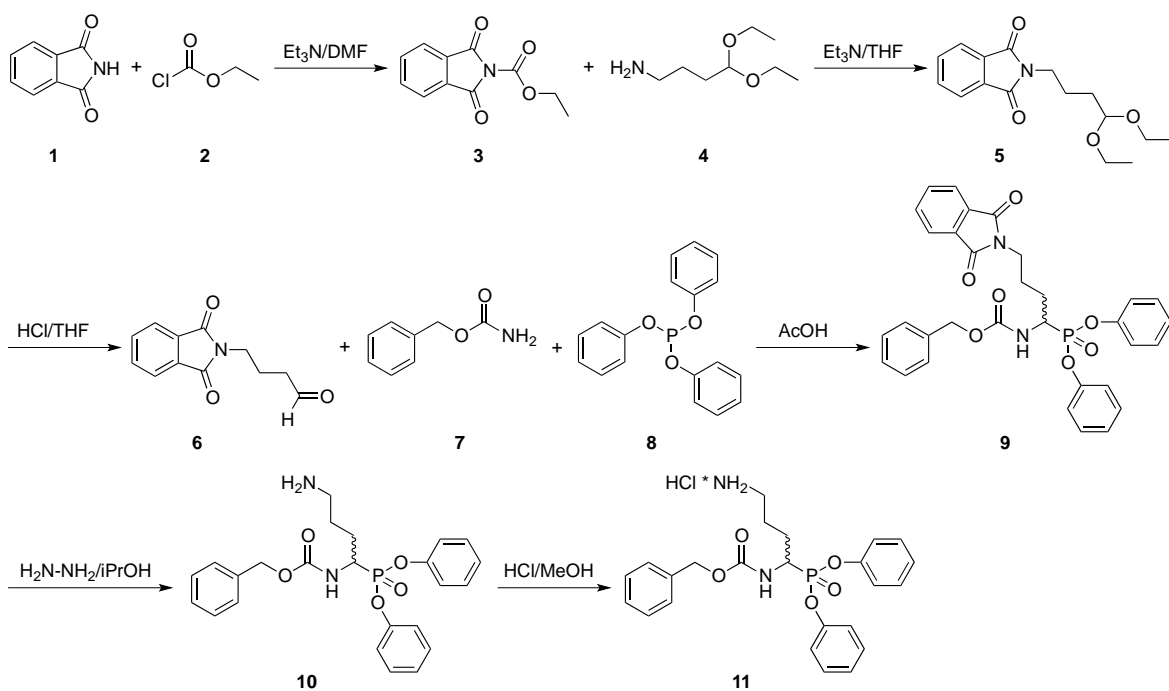
A**APC, trombina, czynnik Xa****czynnik XIa****B**

Rysunek 26. Biotynyłowane markery chemiczne dedykowane APC, trombinie, czynnikowi Xa i XIa. (A) Ogólna struktura markerów chemicznych znakowanych biotyną. (B) Reszty aminokwasowe wybrane w pozycjach P4-P2 do syntezy biotynyłowanych markerów chemicznych na podstawie struktur selektywnych substratów.

Zaprojektowano trzy markery chemiczne pierwszej generacji dla APC: P-SMA61 (biotyna-6-Ahx-Lys-Agp-Igl-Arg^P(OPh)₂), P-SMA171 (biotyna-6-Ahx-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg^P(OPh)₂) oraz P-SMA261 (biotyna-6-Ahx-Lys-βhLys-Igl-Arg^P(OPh)₂). Dla trombiny wybrano dwie selektywne sekwencje peptydowe, na podstawie których zaprojektowano biotynylowane ABPs: P-SMII221 (biotyna-6-Ahx-hCha-Cys(MeBzl)-Pip-Arg^P(OPh)₂) i P-SMII321 (biotyna-6-Ahx-hLeu-Cys(4-MeOBzl)-Pip-Arg^P(OPh)₂). Dla czynnika Xa zaprojektowano trzy takie markery chemiczne: P-SMX91 (biotyna-6-Ahx-DPro-hArg-Bta-Arg^P(OPh)₂), P-SMX151 (biotyna-6-Ahx-DPro-hArg-1-Nal-Arg^P(OPh)₂) oraz P-SMX611 (biotyna-6-Ahx-Met-hArg-1-Nal-Arg^P(OPh)₂), a dla czynnika XIa kolejne dwie struktury: P-SMXI51 (biotyna-PEG(4)-Tyr(2,6-Cl₂-Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg^P(OPh)₂) i P-SMXII91 (biotyna-PEG(4)-Tyr(2,6-Cl₂-Z)-Dht-His(Bzl)-Arg^P(OPh)₂).

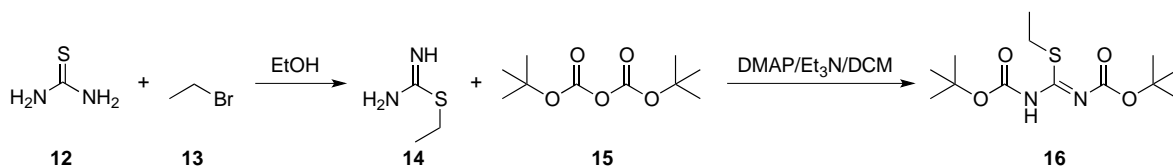
3.3.2. Synteza reaktywnej grupy wiążącej – Cbz-(di-*t*-Boc-Arg)^P(OPh)₂

Synteza markerów chemicznych obejmowała trzy główne etapy. W pierwszej kolejności zsyntetyzowano grupę wiążącą (ang. *warhead*) – Cbz-(di-*t*-Boc-Arg)^P(OPh)₂ – fosfonowy analog argininy (ester difenyłowy kwasu benzyloksykarbonylamino-[(3-di-*t*-Boc-guanidyno)propylo]metanofosfonowego) (**17**) według metodologii opisanej w literaturze [270]. Syntezę rozpoczęto od otrzymania fosfonowego analogu ornityny (**11**) (Rysunek 27). W reakcji ftalimidu (**1**) z chloromrówczanem etylu (**2**) otrzymano *N*-etoksykarbonyloftalimid (**3**), który następnie użyty został do blokowania acetalu dietylowego aldehydu 4-aminomasłowego (**4**). Powstały w ten sposób acetal dietylowy aldehydu *N*-ftaloilo-4-aminomasłowego (**5**) przeprowadzono w aldehyd *N*-ftaloilo-4-aminomasłowy (**6**) przy użyciu kwaśnej hydrolizy. Aldehyd (**6**) wykorzystano w reakcji amidoalkilowania w kwasie octowym [61] otrzymując ester difenyłowy kwasu benzyloksykarbonylamino-[(3-*N*-ftalimido)propylo]metanofosfonowego (**9**). Następnie przy użyciu wodzianu hydrazyny dokonano hydrolizy grupy ftaloilowej (**10**). Dalej związek (**10**) przekształcono w chlorowodorek przy pomocy roztworu kwasu solnego w metanolu w wyniku czego otrzymano fosfonowy analog ornityny (**11**) – chlorowodorek estru difenyłowego kwasu benzyloksykarbonylamino-[(3-amino)propylo]metanofosfonowego.



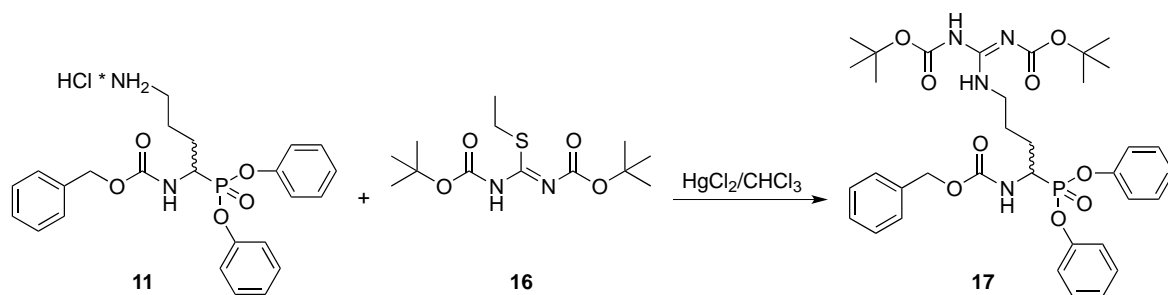
Rysunek 27. Schemat syntezy fosfonowego analogu ornityny (**11**) – chlorowodoreku estru difenyłowego kwasu benzyloksykarbonylamino-[(3-amino)propylo]metanofosfonowego.

Równoległe prowadzona była synteza odczynnika guanidynującego (**16**) (Rysunek 28). Reakcję rozpoczęto od substytucji nukleofilowej przy użyciu tiomocznika (**12**) i bromoetanu (**13**). Otrzymany w ten sposób bromowodorek *S*-etyloizotiomocznika (**14**) przekształcono za pomocą diwęglanu di-*tert*-butylu (**15**) w produkt reakcji – *N,N'*-di-Boc-*S*-etyloizotiomocznik (**16**).



Rysunek 28. Schemat otrzymywania odczynnika guanidynującego (**16**) – *N,N'*-di-Boc-*S*-etyloizotiomocznika.

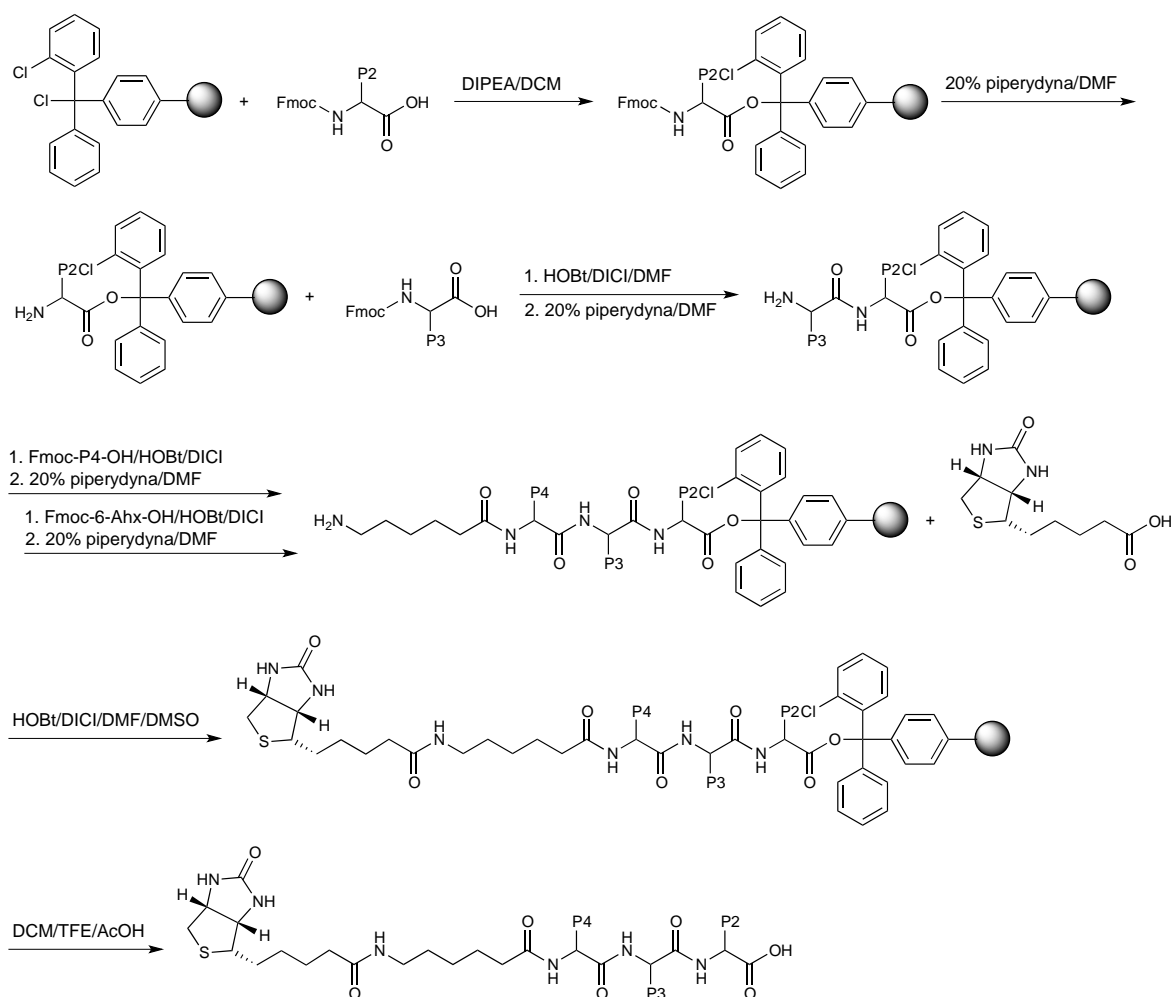
Następnie przeprowadzono reakcję guanidynowania analogu ornityny (**11**) przy pomocy zsyntetyzowanego odczynnika (**16**) otrzymując ostateczny produkt reakcji – fosfonowy analog argininy, Cbz-(di-*t*-Boc-Arg)^P(OPh)₂ (ester difenyloyowy kwasu benzyloksykarbonylamino-[(3-di-*t*-Boc-guanidyno)propylo]metanofosfonowego (**17**) (Rysunek 29).



Rysunek 29. Schemat reakcji guanidynowania fosfonowego analogu ornityny i otrzymywania fosfonowego analogu argininy – grupy wiążącej Cbz-(di-*t*-Boc-Arg)^P(OPh)₂ (**17**).

3.3.3. Synteza fragmentów peptydowych zawierających linker i biotynę

Fragmenty peptydowe markerów pierwszej generacji zawierające linker oraz biotynę zsyntetyzowano na podłożu stałym używając żywicy 2-chlorotrytylowej, dzięki której po hydrolizie związków z żywicy otrzymuje się wolną grupę karboksylową na C-końcu, co umożliwia przyłączenie w kolejnym etapie grupy wiążącej (Rysunek 30). Reakcję rozpoczęto od przyłączenia pierwszego aminokwasu (Fmoc-P2-OH) do żywicy przy użyciu *N,N*-diizopropyletyloaminy (DIPEA) w dichlorometanie (DCM). Reakcję prowadzono 12 godzin, a po tym czasie pozostałe wolne miejsca na żywicy zablokowano roztworem DCM/MeOH/DIPEA (% , v/v/v, 80:15:5). *N*-końcową grupę blokującą Fmoc usunięto przy użyciu 20% piperidyny w *N,N'*-dimetyloformamidzie (DMF). Wydłużanie łańcuchów peptydowych o kolejne aminokwasy (Fmoc-P3-OH, Fmoc-P4-OH) oraz linker (Fmoc-6-Ahx-OH/Fmoc-PEG(4)-OH) przeprowadzono za pomocą odczynników sprzęgających *N*-hydroksybenzotriazol/*N,N'*-diizopropylkarbodiimid (HOBt/DICI) w 2,5-godzinnych cyklach. Biotynę sprzęgnięto do żywicy stosując te same odczynniki sprzęgające (HOBt/DICI), jednak ze względu na słabą rozpuszczalność biotyny w DMF reakcję sprzęgania wykonano w mieszaninie DMF/DMSO (% , v/v, 50:50). Po 3 godzinach żywicę dokładnie wysuszone za pomocą metanolu, a peptydy odcięto za pomocą mieszaniny DCM/TFE/AcOH (% , v/v/v, 80:10:10). Otrzymane związki (**18**) zliofilizowano i użyto do dalszej reakcji bez wcześniejszego oczyszczenia.



18

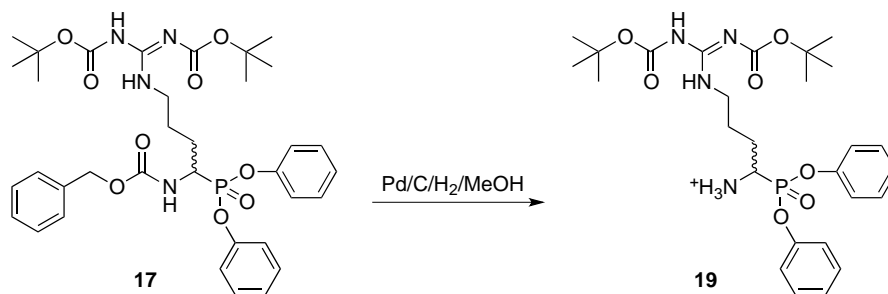
Rysunek 30. Schemat syntezy na podłożu stałym fragmentów peptydowych zawierających linker (dla przykładu – 6-Ahx) oraz biotynę.

3.3.4. Otrzymywanie biotynylowanych markerów chemicznych

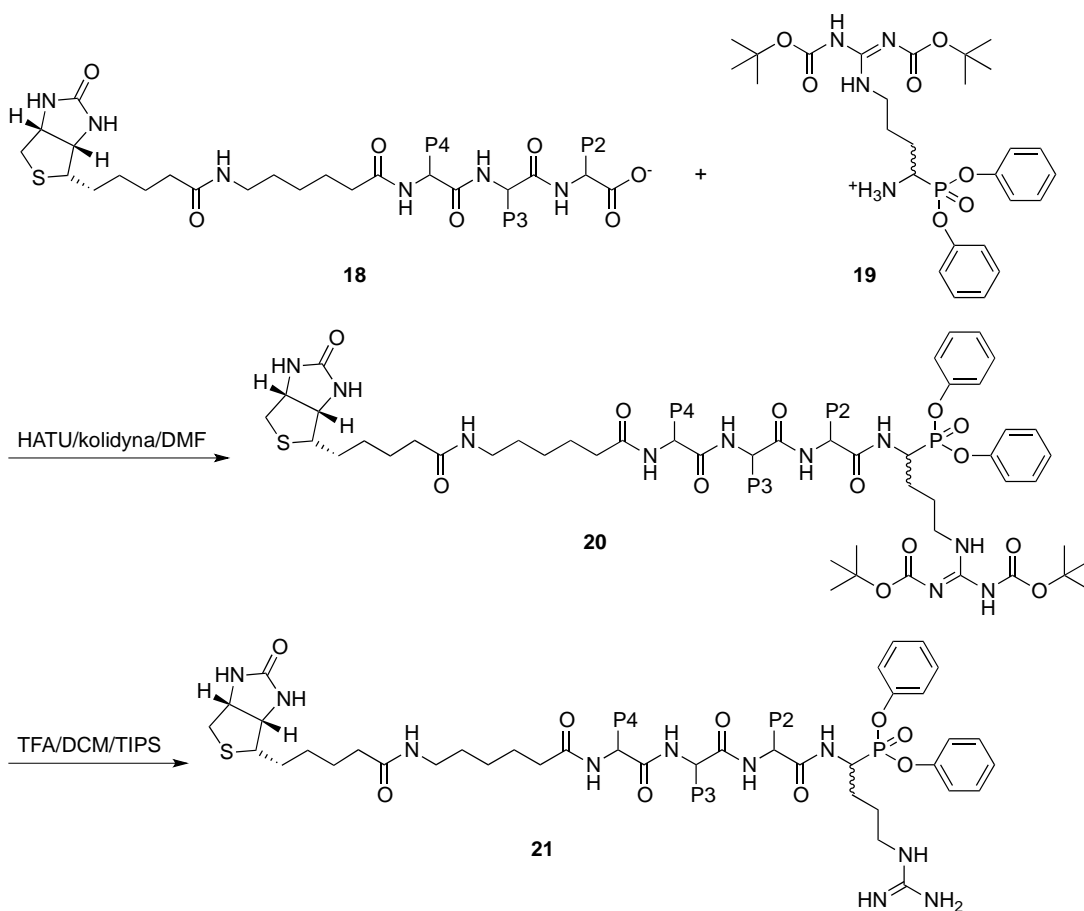
W kolejnym kroku usunięto grupę blokującą Cbz z zsyntetyzowanego wcześniej fragmentu reagującego Cbz-(di-*t*-Boc-Arg)^P(OPh)₂ (**17**) przy użyciu palladu na węglu w atmosferze wodoru (Rysunek 31A), a otrzymany ⁺H₃N-(di-*t*-Boc-Arg)^P(OPh)₂ (**19**) sprzęgano z otrzymanymi sekwencjami peptydowymi (**18**) metodą syntezy w roztworze przy użyciu odczynników sprzęgających (HATU/2,4,6-kolidyna) (Rysunek 31B). Reakcję prowadzono przez 2 godziny, monitorowano za pomocą analitycznego HPLC, a po przereagowaniu fragmentu wiążącego i części peptydowej reakcję zakończono poprzez rozpuszczenie produktów w octanie etylu i ich ekstrakcję w 5% NaHCO₃, 5% kwasie cytrynowym i solance. Po odparowaniu rozpuszczalnika usunięto grupy blokujące na łańcuchach bocznych aminokwasów za pomocą mieszaniny TFA/DCM/TIPS

(%, v/v/v, 80:15:5). Otrzymane związki (**21**) oczyszczano na półpreparatywnym HPLC. Ich czystość potwierdzono za pomocą HPLC analitycznego, a masę cząsteczkową poprzez analizę ESI-MS. Następnie je zliofilizowano i rozpuszczono w DMSO do końcowego stężenia równego 10 mM.

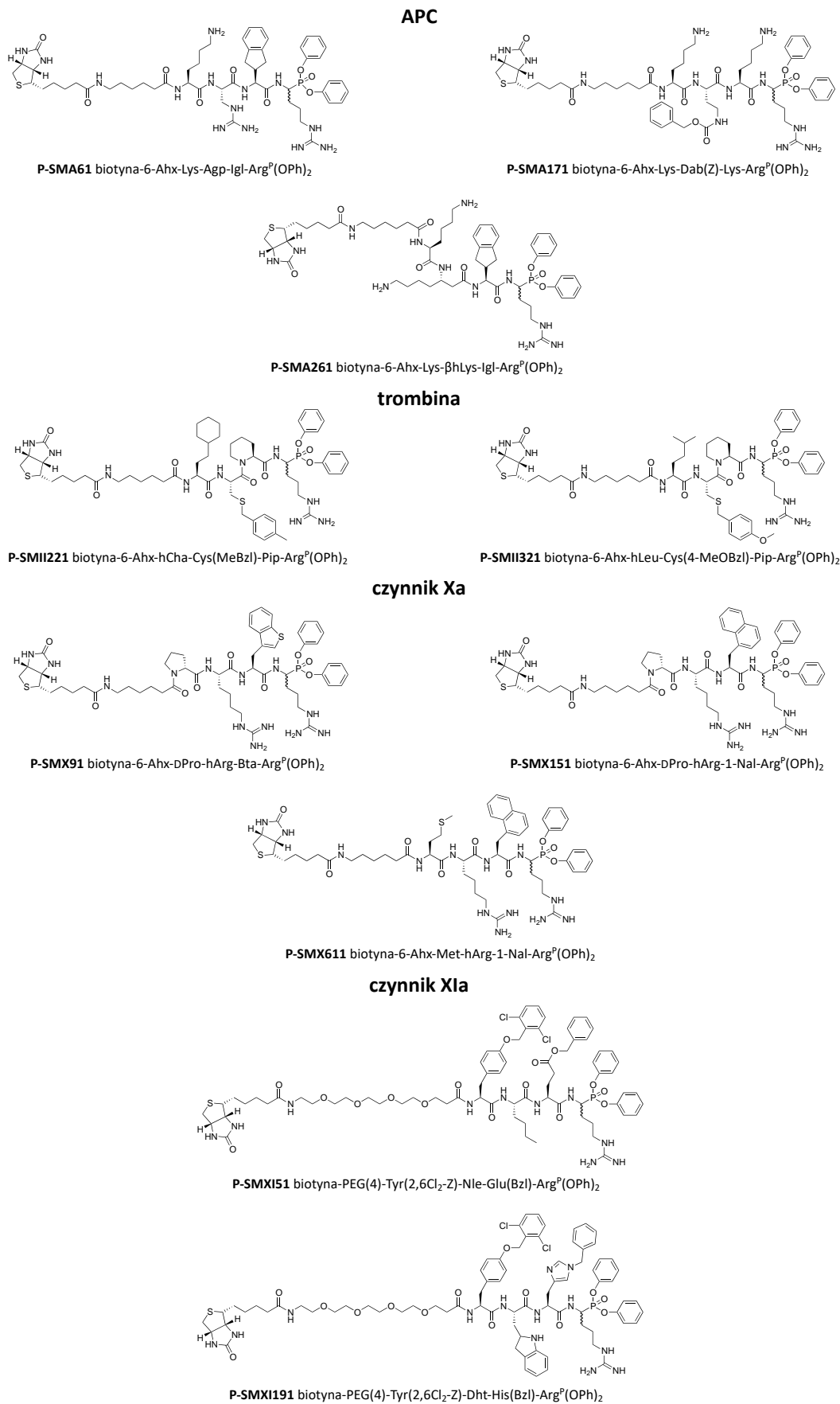
A



B



Rysunek 31. Schemat syntezy biotynylowanych markerów chemicznych (**21**). (A) Otrzymywanie odblokowanej grupy wiążącej ^+H_3N -(di-*t*-Boc-Arg)^P(OPh)₂ (**19**). (B) Sprzęgnięcie fragmentów peptydowych zawierających linker (dla przykładu – 6-Ahx) oraz biotynę (**18**) z grupą wiążącą (**19**) oraz usuwanie grup ochronnych z (**20**) i otrzymanie biotynylowanych markerów chemicznych (**21**).



Rysunek 32. Struktury biotynylowanych markerów chemicznych dla czynników krzepnięcia.

3.3.5. Badanie selektywności biotynylowanych markerów chemicznych przy użyciu metody SDS-PAGE

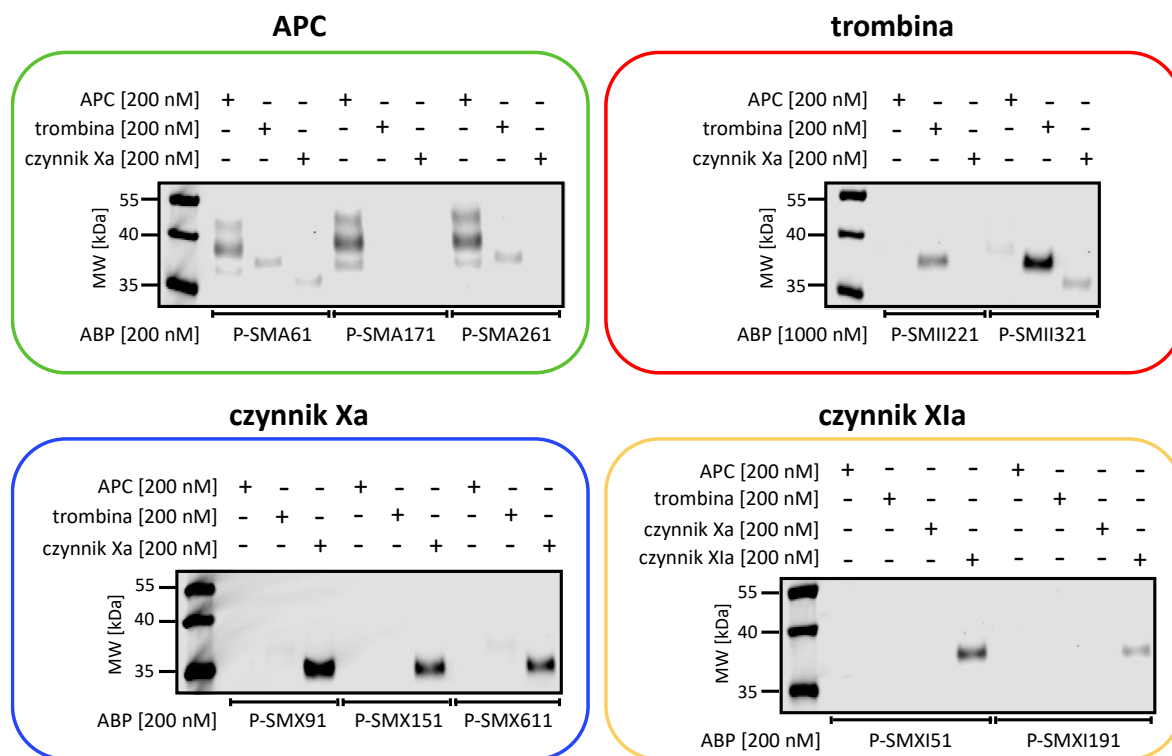
Biotynylowane markery chemiczne w swojej strukturze posiadały dwie modyfikacje odróżniające je od wcześniej otrzymanych dedykowanych tetrapeptydowych substratów. Fluorescencyjny znacznik ACC w pozycji P1' zamieniony został na fosfonian difenyłu, a *N*-końcową grupę acetylową zastąpiono biotyną. Zmiany te mogły wpłynąć na selektywność, dlatego w kolejnym eksperymencie sprawdzono, które ABPs ją zachowały i dzięki temu mogłyby znaleźć zastosowanie w badaniach biologicznych nad aktywnością czynników krzepnięcia. Postanowiono to sprawdzić znakując oczyszczone czynniki krzepnięcia otrzymanymi markerami chemicznymi (Rysunek 33). Mając na uwadze podobieństwo strukturalne APC, trombiny i czynnika Xa, ich zbliżone preferencje substratowe oraz przynależność do tej samej rodziny czynników krzepnięcia zależnych od witaminy K [15, 16, 82, 151] do analizy selektywności dedykowanych im markerów użyto tych trzech enzymów. W przypadku czynnika XIa, jego markery zbadano względem wszystkich czterech proteazach serynowych (APC, trombina, czynnik Xa, czynnik XIa), ponieważ zaburzenie aktywności tych enzymów występuje w takich samych stanach patofizjologicznych jak w przypadku czynnika XIa (choroby zakrzepowo-zatorowe). Wykorzystując takie markery do badania obecności i aktywności czynnika XIa w złożonych próbkach biologicznych zawierających wszystkie te enzymy, selektywność ABPs musi zostać zachowana.

Biotynylowane markery były inkubowane oddzielnie z każdą aktywną proteazą przez 30 minut w temperaturze 37°C, a stosunek stężenia marker:enzym wynosił 1 lub 5, w zależności od użytego ABP. Próbki następnie denaturowano za pomocą roztworu SDS/DTT, który nadał białkom wypadkowy ładunek ujemny (pozwalając na ich migrację w dół żelu w kierunku anody) oraz zredukował mostki disiarczkowe. Z założenia zastosowane markery chemiczne powinny wiązać się kowalencyjnie w miejscu aktywnym enzymów, co zostało potwierdzone, gdyż denaturacja białek nie wpłynęła negatywnie na detekcję badanych proteaz. Tak przygotowane próbki naniesiono na 12% żel poliakrylamidowy i przeprowadzono elektroforezę, po której nastąpił transfer białek na membranę nitrocelulozową. Membrany wiążąc na swojej powierzchni białka zadziałały jak matryca, której użyto następnie do związania znakowanej fluorescencyjnie streptawidyny. Streptawidyna wykazuje bardzo silne powinowactwo do biotyny znajdującej

się w markerach pierwszej generacji, dzięki czemu wiąże się z nimi, a zastosowany koniugat zaopatrzony we fluorescencyjny znacznik umożliwia detekcję biotynylowanych markerów chemicznych związanych z enzymami.

W pierwszej kolejności zbadano markery chemiczne zaprojektowane dla APC: P-SMA61, P-SMA171 i P-SMA261. Analiza ta pokazała, że wszystkie trzy ABPs były zdolne do znakowania APC, jednakże P-SMA61 wykazywał aktywność krzyżową z trombiną i czynnikiem Xa, a P-SMA261 znakował trombinę. Zaobserwowano, że P-SMA171 nie tylko silnie znakował APC, ale też nie rozpoznawał innych proteaz, a ponieważ głównym celem było znalezienie wysoce selektywnej sekwencji peptydowej, to właśnie ta wybrana została do dalszych badań. Następnie przeanalizowano aktywność wiązania P-SMII221 i P-SMII321, markerów pierwszej generacji zaprojektowanych dla trombiny. Po reakcji z obydwoma ABPs zaobserwowano sygnał pochodzący od białka o masie między 35 a 40 kDa, co odpowiada wielkości trombiny. Okazało się, że P-SMII221 był mniej aktywnie rozpoznawany, ale bardziej selektywny względem trombiny niż P-SMII321, dlatego został wybrany do dalszej detekcji trombiny w próbkach biologicznych. Wszystkie trzy ABPs zaprojektowane dla czynnika Xa były selektywne i dobrze rozpoznawane. Dokładna analiza wykazała, że P-SMX91 i P-SMX611 nieznacznie znakowały trombinę. Modyfikacja struktury P-SMX611, w której wymieniono L-Met w pozycji P4 na D-Pro pozwoliła na otrzymanie P-SMX151. Zmiana ta ograniczyła reakcję krzyżową z trombiną zachowując jednocześnie aktywność rozpoznawania tego markera przez czynnik Xa. Następnie scharakteryzowano znakowanie biotynylowanych ABPs względem czynnika XIa i reszty badanych enzymów. Po analizie Western blot markerów P-SMXI51 i P-SMXI191 zaobserwowano tylko jeden sygnał pochodzący od białka o masie pomiędzy 35 a 40 kDa, odpowiadający monomerowi czynnika XIa. Wynik ten wskazywał na bardzo wysoki stopień selektywności obu ABPs w stosunku do czynnika XIa. Zaobserwowano, że P-SMXI51 silniej znakował czynnik XIa od P-SMXI191, co czyniło tę sekwencję obiecującą w kontekście wykorzystania jej w dalszych badaniach.

Biotynylowane markery chemiczne



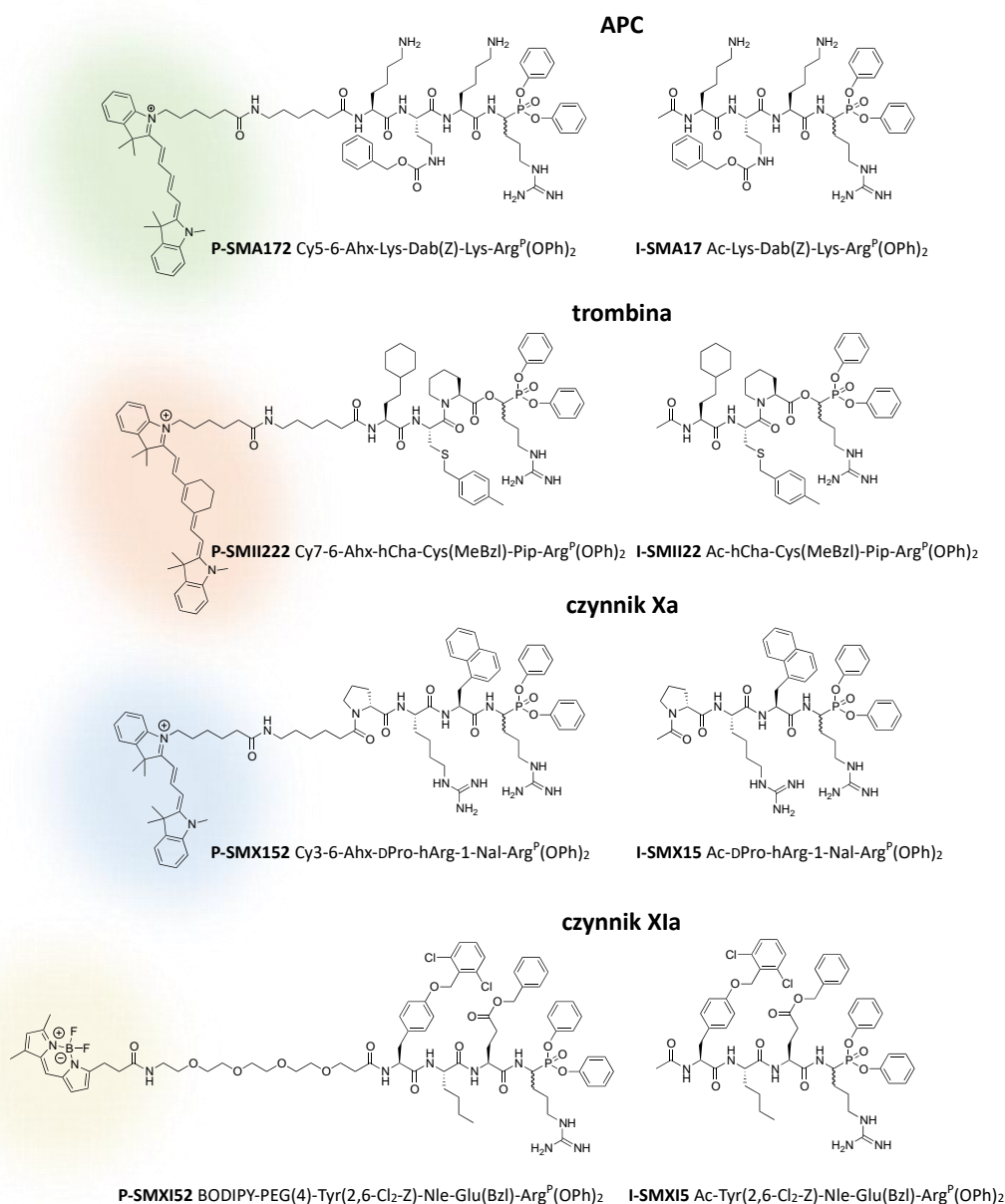
Rysunek 33. Znakowanie oczyszczonych czynników krzepnięcia (APC, trombina, czynnik Xa, czynnik XIa) przy użyciu biotynylowanych markerów chemicznych. Enzymy (200 nM) inkubowano oddzielnie z każdym markerem (stosunek marker:enzym wynosił 1 lub 5, w zależności od użytego ABP) przez 30 minut w temperaturze 37°C. Próbkę następnie poddawano analizie SDS-PAGE i Western blot, a otrzymane membrany inkubowano ze znakowaną fluorescencyjnie (Alexa Fluor 647) streptawidyną. Biotynylowane markery chemiczne następnie detektowano przy długości fali 658 nm za pomocą urządzenia Azure Biosystems Sapphire Biomolecular Imager. Przedstawione dane odzwierciedlają co najmniej trzy oddzielne eksperymenty.

3.4. Fluorescencyjne markery chemiczne i inhibitory

3.4.1. Projektowanie fluorescencyjnych markerów chemicznych i inhibitorów

Fluorescencyjne markery są doskonałym narzędziem do obrazowania aktywności proteaz w próbkach biologicznych ze względu na ich wysoki molowy współczynnik ekstynkcji oraz możliwość detekcji znakowanych nimi białek w tak niskich stężeniach jak 1 nM [271]. Dodatkowo, co odróżnia je od biotyny to możliwość jednoczesnej i bezpośredniej detekcji wielu enzymów bezpośrednio w żelu poliakrylamidowym, eliminując konieczność czasochłonnego transferu białek. Dlatego w kolejnym etapie badań wymieniono biotynę na różne znaczniki fluorescencyjne i zsyntetyzowano po jednym markerze chemicznym dla każdego czynnika krzepnięcia. Wybrano fluorofory takie jak

cyjanina 3, cyjanina 5, cyjanina 7 i BODIPY FLodipy, które charakteryzują się minimalnym nakładaniem widm emisji fluorescencji. W projektowaniu markerów chemicznych wykorzystano wcześniej otrzymane selektywne sekwencje peptydowe i zsyntetyzowano cztery ABPs drugiej generacji o ogólnych strukturach Cy5-6-Ahx-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg^P(OPh)₂ (P-SMA172) dla APC, Cy7-6-Ahx-hCha-Cys(MeBzl)-Pip-Arg^P(OPh)₂ (P-SMII222) dla trombiny, Cy3-6-Ahx-DPro-hArg-1-Nal-Arg^P(OPh)₂ (P-SMX152) dla czynnika Xa oraz BODIPY-PEG(4)-Tyr(2,6-Cl₂-Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg^P(OPh)₂ (P-SMXI52) dla czynnika XIa (Rysunek 34).

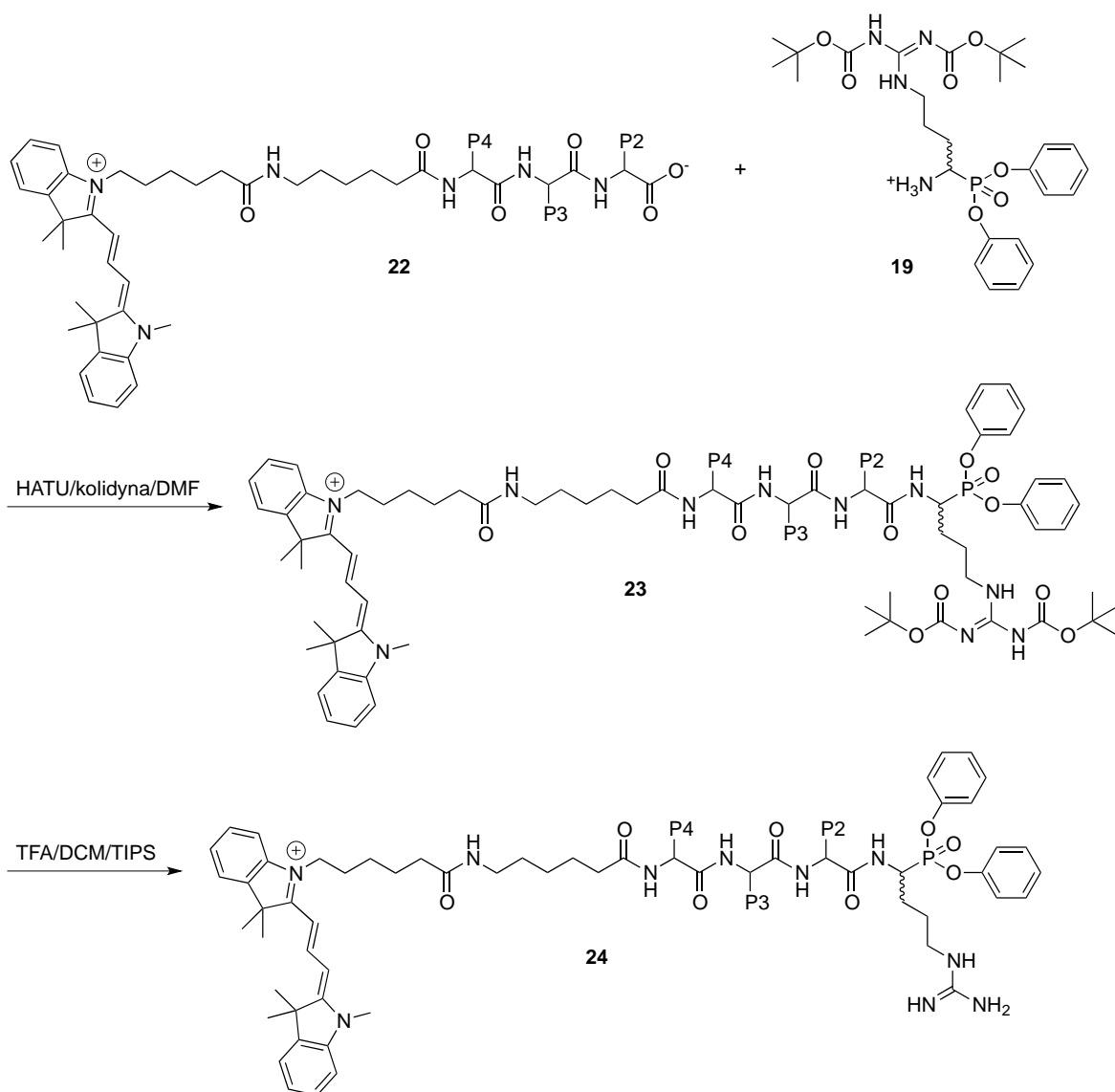


Rysunek 34. Struktury fluorescencyjnych markerów chemicznych i inhibitorów dedykowanych APC, trombinie, czynnikowi Xa i czynnikowi XIa.

Otrzymane markery chemiczne w swojej strukturze posiadały reaktywną grupę wiążącą (fosfonian difenyłu), która nieodwracalnie wiąże się w miejscu aktywnym proteaz, nadając markerom właściwości inhibitora kowalencyjnego [60]. Aby uzbroić się w cały wachlarz narzędzi chemicznych umożliwiających badanie aktywności czynników krzepnięcia, w kolejnym kroku zastąpiono znaczniki fluorescencyjne grupą acetylową i zaprojektowano zestaw prostych inhibitorów peptydowych. Zsyntetyzowano cztery inhibitory, mianowicie I-SMA17 (Ac-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg^P(OPh)₂), I-SMII22 (Ac-hCha-Cys(MeBzl)-Pip-Arg^P(OPh)₂) i I-SMX15 (Ac-DPro-hArg-1-Nal-Arg^P(OPh)₂), I-SMXI5 (Ac-Tyr(2,6-Cl₂-Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg^P(OPh)₂) odpowiednio do badania aktywności APC, trombiny, czynnika Xa i czynnika XIa (Rysunek 34).

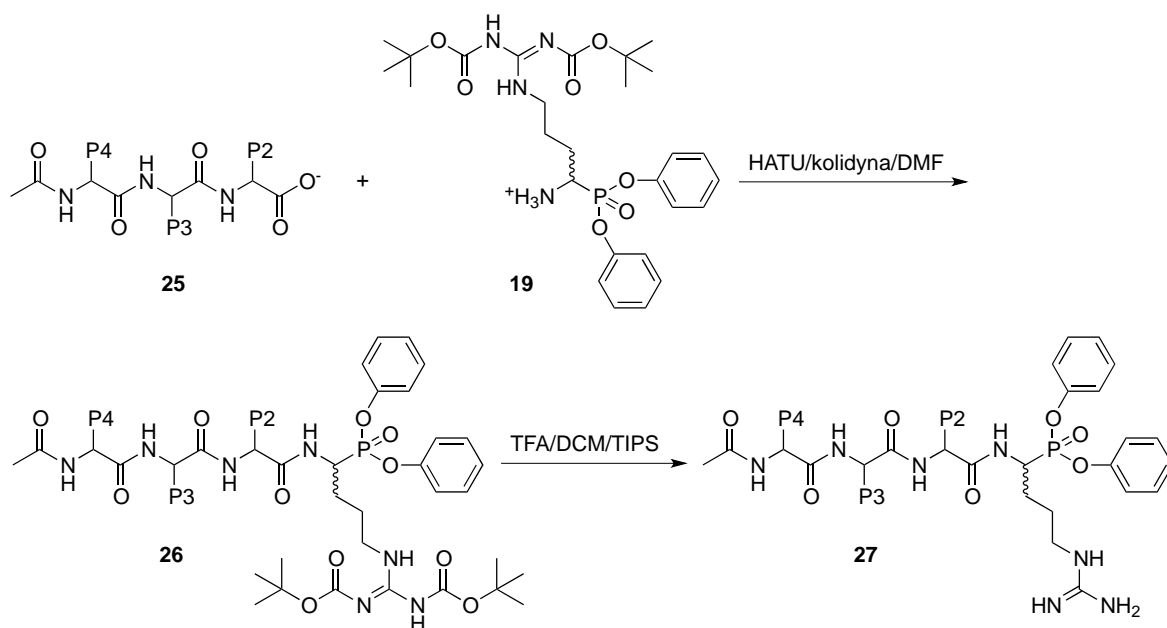
3.4.2. Synteza fluorescencyjnych markerów chemicznych i inhibitorów

Metoda syntezy fluorescencyjnych markerów chemicznych oraz inhibitorów była analogiczna do syntezy biotynylowanych markerów. W przypadku markerów drugiej generacji syntezę fragmentów peptydowych z linkerem dokonano na żywicy 2-chlorotrytylowej, a znaczniki fluorescencyjne sprzęgano przy użyciu DIPEA przez noc. Fragmenty te następnie odłączono od żywicy (**22**), zliofilizowano i sprzęgnięto z grupą wiążącą (**19**). Reakcję monitorowano przy pomocy HPLC analitycznego, następnie przeprowadzono ekstrakcję otrzymanych związków (**23**) oraz ściąganie grup blokujących kwasem trifluoroctowym (**24**). Otrzymane związki oczyszczano, a ich czystość i masę potwierdzono. Następnie je zliofilizowano i rozpuszczono w DMSO do końcowego stężenia równego 10 mM (Rysunek 35).



Rysunek 35. Schemat syntezy fluorescencyjnych markerów chemicznych (**24**). Sprzężanie fragmentów peptydowych zawierających linker (dla przykładu – 6-Ahx) oraz fluorofor (dla przykładu – Cy3) (**22**) z grupą wiążącą (**19**) oraz usuwanie grup ochronnych z (**23**) i otrzymanie fluorescencyjnych markerów chemicznych (**24**).

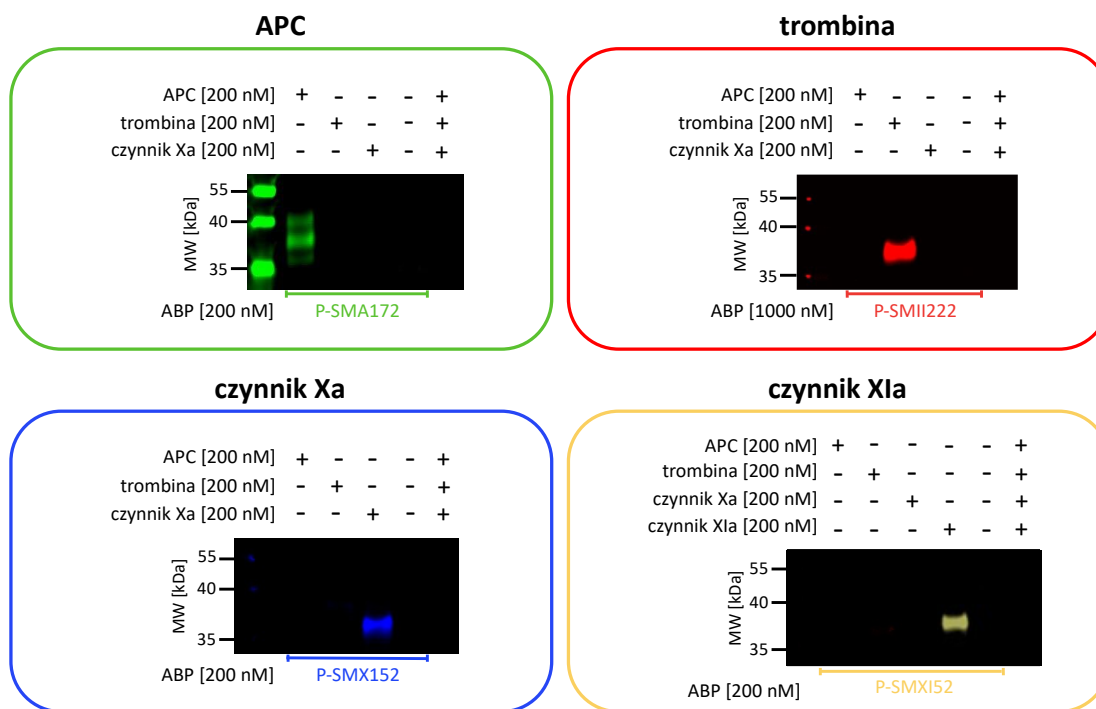
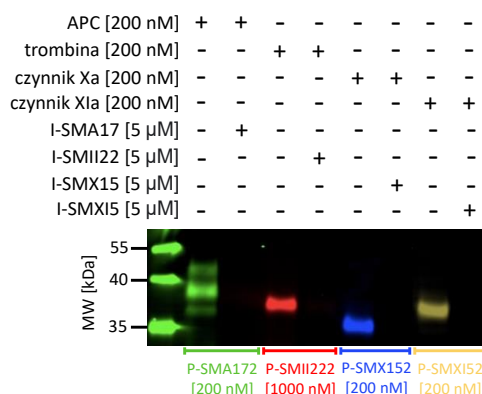
W celu otrzymania inhibitorów, grupę aminową fragmentu peptydowego (bez linkera) poddano reakcji acetylacji przy użyciu AcOH, HBTU i DIPEA przez godzinę. Tak przygotowane fragmenty peptydowe (**25**) poddano analogicznym reakcjom jak w przypadku syntezy biotynylowanych i fluorescencyjnych markerów chemicznych otrzymując ostatecznie gotowe inhibitory (**27**) (Rysunek 36).



Rysunek 36. Schemat syntezy inhibitorów (26). Sprzężanie zacetylowanych fragmentów peptydowych (25) z grupą wiążącą (19) oraz usuwanie grup ochronnych z (26) i otrzymanie inhibitorów (27).

3.4.2. Badanie selektywności fluorescencyjnych markerów chemicznych przy użyciu metody SDS-PAGE

Aby ocenić użyteczność i selektywność fluorescencyjnych markerów chemicznych w znakowaniu odpowiednich czynników krzepnięcia, przeprowadzono analizę SDS-PAGE w identycznych warunkach, jak poprzednio w przypadku biotynylowanych ABPs (stosunek marker:enzym wynosił 1 lub 5, w zależności od użytego ABP, a czas inkubacji 30 minut). Jako kontrole zastosowano jedynie markery lub enzymy (Rysunek 37A). Po transferze białek na membrany nitrocelulozowe, analizowano je przy użyciu różnych długości fal dobranych odpowiednio do zastosowanych znaczników fluorescencyjnych. Zaobserwowano cztery wyraźne sygnały fluorescencyjne generowane przez znakowanie każdej proteazy jej selektywnym markerem oraz brak innych pasm mogących świadczyć o potencjalnej aktywności krzyżowej markerów z innymi czynnikami krzepnięcia. Dodatkowo w rzędach, gdzie naniesiono kontrole, nie zaobserwowano żadnych prążków, co wyklucza możliwość występowania zjawiska autofluorescencji pochodzącej od markerów lub enzymów. Na podstawie otrzymanych wyników potwierdzono wysoką selektywność markerów chemicznych drugiej generacji i możliwość ich zastosowania w próbkach biologicznych zawierających wiele czynników krzepnięcia krwi jednocześnie.

A**Fluorescencyjne markery chemiczne****B****Znakowanie i inhibicja**

Rysunek 37. Fluorescencyjne markery chemiczne i inhibitory dedykowane APC, trombinie, czynnikowi Xa i czynnikowi XIa. (A) Znakowanie oczyszczonych czynników krzepnięcia fluorescencyjnymi ABP. Enzymy (200 nM) inkubowano oddzielnie z każdym markerem (stosunek marker:enzym wynosił 1 lub 5, w zależności od użytego ABP) przez 30 minut w temperaturze 37°C. Próbkę następnie poddawano analizie SDS-PAGE i Western blot, a otrzymane membrany wizualizowano przy długości fali 520 nm dla Cy3, 658 nm dla Cy5, 784 nm dla Cy7 oraz 488 nm dla BODIPY przy użyciu urządzenia Azure Biosystems Sapphire Biomolecular Imager. Przedstawione dane odzwierciedlają co najmniej trzy oddzielne eksperymenty biologiczne. (B) Jednoczesne znakowanie i inhibicja czynników krzepnięcia. Każdy enzym (200 nM) inkubowano z odpowiednim inhibitorem (końcowe stężenie inhibitora 5 μM) przez 60 minut. Następnie do każdej próbki dodano odpowiedni marker chemiczny (stosunek marker:enzym wynosił 1 lub 5, w zależności od użytego ABP, 30 minut). Próbkę poddawano elektroforezie i transferowi na membranę. Wizualizację wykonano w taki sam sposób jak opisano wyżej.

3.4.3. Jednoczesne znakowanie oraz inhibicja czynników krzepnięcia krwi przy użyciu fluorescencyjnych markerów chemicznych i inhibitorów

Niskocząsteczkowe markery chemiczne z założenia reagują z centrum aktywnym enzymów. W celu zbadania selektywności wiązania się ABPs drugiej generacji z miejscem aktywnym badanych proteaz w kolejnym eksperymencie przed dodaniem markerów chemicznych, czynniki krzepnięcia zostały wstępnie zahamowane za pomocą dedykowanych im inhibitorów. APC inkubowano z I-SMA17, trombinę z I-SMII22, czynnik Xa z I-SMX15, a czynnik XIa potraktowano I-SMXI5 (5 μ M każdego inhibitora, 60 minut inkubacji). Następnie do próbek dodano odpowiednie fluorescencyjne markery chemiczne (stosunek marker:enzym wynosił 1 lub 5, w zależności od użytego ABP, a czas inkubacji 30 minut). Jako kontrole użyto proteazy traktowane tylko odpowiednimi ABPs (Rysunek 37B). Analiza Western blot wykazała, że wszystkie cztery inhibitory zablokowały miejsca aktywne badanych proteaz, uniemożliwiając wiązanie się markerów chemicznych. Wyniki te świadczą o tym, że markery chemiczne drugiej generacji wiążą się w obrębie miejsca aktywnego enzymów, dodatkowo potwierdzając przydatność tych narzędzi chemicznych i możliwość ich zastosowania do badania aktywności APC, trombiny, czynnika Xa i czynnika XIa w próbkach biologicznych.

3.4.3. Badania kinetyczne fluorescencyjnych markerów chemicznych i inhibitorów

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie aktywności i selektywności otrzymanych markerów chemicznych i inhibitorów poprzez wyznaczenie ich parametrów kinetycznych względem badanych czynników krzepnięcia. W tym celu do każdego enzymu dodano seryjnie rozcieńczony marker lub inhibitor, a następnie użyto wcześniej zsyntetyzowanych substratów (dobranych dla każdego enzymu indywidualnie), dla których badano stopień hydrolizy w zależności o użytego stężenia markera lub inhibitora. Do eksperymentu użyto stężeń markerów/inhibitorów w zakresie od 308 nM do 100 μ M, w zależności od użytego związku oraz stałego stężenia każdego z enzymów (10 nM). Równolegle prowadzono także pomiar kontrolny, w którym obserwowano hydrolizę substratu bez markera/inhibitora. Wykres zależności stężenia markera/inhibitora od aktywności enzymu utworzony w programie GraphPad Prism pozwolił na wyliczenie pozornej stałej szybkości drugiego rzędu $k_{obs(app)}/I$. Aby wyznaczyć właściwości inhibicyjne każdego markera/inhibitora posłużono się wartością k_{obs}/I , którą wyliczono z równania $k_{obs}/I = k_{obs(app)}/I \times (1+[S]/K_M)$, gdzie K_M to stała Michaelisa-Menten dla danego substratu, a $[S]$ to jego użyte stężenie.

Analiza kinetyczna inhibitora (I-SMA17) i markera (P-SMA172) dedykowanego APC wykazała bardzo dobrą wydajność inhibicji względem APC z wartościami k_{obs}/I wynoszącymi odpowiednio $1980 \pm 20 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ i $2250 \pm 170 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tabela 7). Zgodnie z przewidywaniami, nie zaobserwowano reakcji krzyżowej I-SMA17 oraz P-SMA172 z trombiną i czynnikiem Xa, co odzwierciedla wyniki analizy SDS-PAGE (Rysunek 37A). Porównanie wartości k_{obs}/I narzędzi chemicznych dedykowanych trombinie wykazało, że I-SMII22 hamował trombinę ($k_{obs}/I = 209000 \pm 13\,800 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) 348- i 2087-krotnie lepiej niż odpowiednio APC ($k_{obs}/I = 600 \pm 30 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) i czynnik Xa ($k_{obs}/I = 100 \pm 0,1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Zamiana *N*-końca z grupy acetylowej (I-SMII22) na dużą pochodną cyjaninową Cy7 (P-SMII222) znacząco zmniejszyła wartość k_{obs}/I markera do $3500 \pm 300 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Wynika to prawdopodobnie z zawady sterycznej w kieszeniach oddalonych od miejsca aktywnego enzymu, spowodowanej dużym rozmiarem znacznika fluorescencyjnego. Marker P-SMII222 zachował jednak swoją selektywność, na co wskazywała analiza Western blot, a co potwierdziły badania kinetyczne (Rysunek 37A, Tabela 7). Zaobserwowano, że narzędzia chemiczne dedykowane czynnikowi Xa: I-SMX15 i P-SMX152 wiązały się z czynnikiem Xa z podobnymi stałymi szybkości inhibicji, odpowiednio $k_{obs}/I = 1200 \pm 100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ i $k_{obs}/I = 1800 \pm 100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Co ważne, nie zaobserwowano również krzyżowej aktywności P-SMX152 z trombiną, podczas gdy hamowanie APC było 75-krotnie mniej wydajne, co potwierdziło selektywność fluorescencyjnego markera względem czynnika Xa (Tabela 7).

Tabela 7. Parametry kinetyczne (k_{obs}/I) fluorescencyjnych markerów chemicznych i inhibitorów APC, trombiny i czynnika Xa względem tych czynników krzepnięcia. Dane przedstawiają wartości średnie \pm s.d.; $n = 3$, gdzie n oznacza liczbę niezależnych eksperymentów.

marker chemiczny/inhibitor	k_{obs}/I [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]		
	APC	trombina	czynnik Xa
P-SMA172 Cy5-6-Ahx-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg ^P (OPh) ₂	2250 ± 170	NW	NW
I-SMA17 Ac-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg ^P (OPh) ₂	1980 ± 20	NW	NW
P-SMII222 Cy7-6-Ahx-hCha-Cys(MeBzl)-Pip-Arg ^P (OPh) ₂	292 ± 4	3500 ± 300	375 ± 36
I-SMII22 Ac-hCha-Cys(MeBzl)-Pip-Arg ^P (OPh) ₂	600 ± 30	209000 ± 13800	$100 \pm 0,1$
P-SMX152 Cy3-6-Ahx-DPro-hArg-1-Nal-Arg ^P (OPh) ₂	24 ± 1	NW	1800 ± 100
I-SMX15 Ac-DPro-hArg-1-Nal-Arg ^P (OPh) ₂	90 ± 6	90 ± 1	1200 ± 100

(NW) nie wyznaczono ze względu na niską inhibicję enzymu

W przypadku narzędzi chemicznych dedykowanych czynnikowi XIa zaobserwowano, że zamiana *N*-końcowej grupy acetylowej na fluorofor BODIPY FL spowodowała wyraźne obniżenie wartości k_{obs}/I z $54700 \pm 2800 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dla I-SMXI5 na $3120 \pm 100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ w przypadku markera P-SMXI52. Odzwierciedlać to może preferencje katalityczne czynnika XIa poza kieszeniami P4-P1. Marker P-SMXI52 zachował jednak swoją selektywność (Rysunek 37A, Tabela 8), co czyni go pierwszym opisanym selektywnym fluorescencyjnym ABP dedykowanym czynnikowi XIa.

Tabela 8. Parametry kinetyczne (k_{obs}/I) fluorescencyjnego markera chemicznego i inhibitora czynnika XIa względem APC, trombiny, czynnika Xa i czynnika XIa. Dane przedstawiają wartości średnie \pm s.d.; $n = 3$, gdzie n oznacza liczbę niezależnych eksperymentów.

marker chemiczny/inhibitor	k_{obs}/I [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]			
	APC	trombina	czynnik Xa	czynnik XIa
P-SMXI52 Bodipy-PEG(4)-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg ^P (OPh) ₂	NW	NW	NW	3120 ± 100
I-SMXI5 Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg ^P (OPh) ₂	1570 ± 20	NW	100 ± 13	54700 ± 2800

(NW) nie wyznaczono ze względu na niską inhibicję enzymu

3.5. Znakowanie czynników krzepnięcia w ludzkim osoczu

3.5.1. Optymalizacja warunków detekcji czynników krzepnięcia w ludzkim osoczu

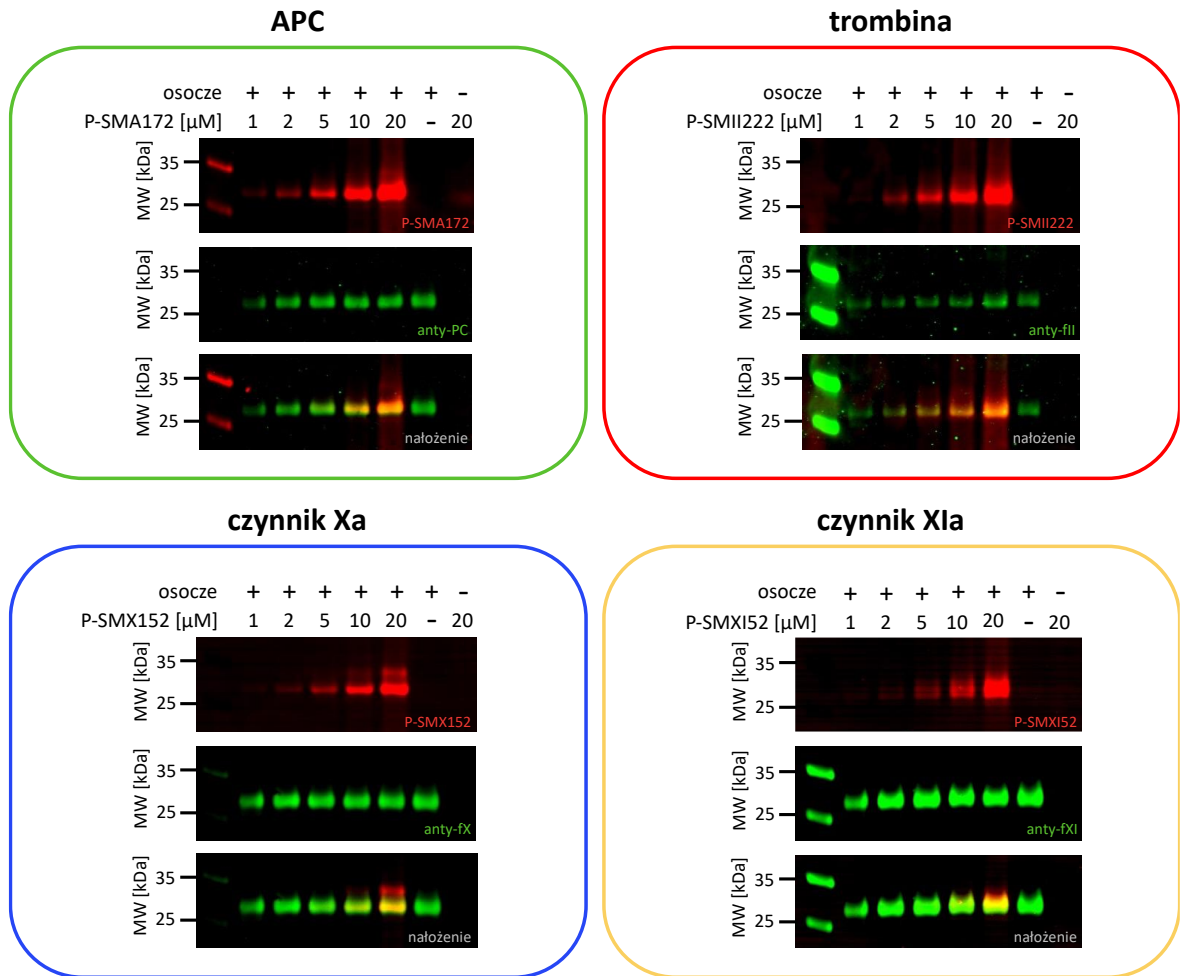
Głównym celem badań było opracowanie narzędzi zdolnych nie tylko do wizualizacji i rozróżniania oczyszczonych czynników krzepnięcia, ale także do ich detekcji w złożonych próbkach biologicznych. Wcześniejsze znakowanie przy użyciu metody SDS-PAGE i analiza kinetyczna wykazały, że markery P-SMA172, P-SMII222, P-SMX152 i P-SMXI52 selektywnie wiążą się i detektują odpowiednio APC, trombinę, czynnik Xa i czynnik XIa. Aby sprawdzić przydatność tych narzędzi chemicznych w znakowaniu czynników krzepnięcia w próbkach biologicznych, do kolejnego eksperymentu wybrano ludzkie osocze. Jest to złożony kompleks biologiczny, w którym obecnych jest wiele białek oraz wszystkie czynniki krzepnięcia [16, 191], które mogłyby zostać błędnie wyznaczone przez nieselektywne ABPs. Otrzymane fluorescencyjne markery chemiczne drugiej generacji w swojej strukturze posiadały fosfonianową grupę wiążącą, dzięki której działanie markerów skierowane było tylko na proteazy serynowe, a dodatkowo selektywność zapewniać także miał indywidualnie dobrany do każdego enzymu fragment peptydowy. W kolejnym etapie badań sprawdzono czy fluorescencyjne markery wyznakują odpowiednie

białka w próbkach ludzkiego osocza oraz w jakich warunkach znakowanie to będzie selektywne i nie wystąpią tzw. wiązania krzyżowe z innymi proteazami.

W pierwszej części badań nad wizualizacją czynników krzepnięcia w ludzkim osoczu sprawdzono limit detekcji każdego enzymu przy zmiennym stężeniu markerów. Znakowanie scharakteryzowano poprzez inkubację chelatowanego EDTA osocza z czterema fluorescencyjnymi ABPs (oddzielnie) w stężeniach od 1 do 20 μM przez 60 minut (Rysunek 38). Wyższe stężenie markerów oraz podwojony czas inkubacji w porównaniu do poprzednich eksperymentów na celu miały sprawdzenie, czy w takich warunkach nadmiar danego markera po wyznakowaniu odpowiedniego enzymu nie zwiąże się nieselektywnie z innymi proteazami. Jako kontrolę zastosowano osobno osocze i markery. Gotowe próbki poddano analizie SDS-PAGE i Western blot, a membrany następnie inkubowano z przeciwciałami anti-PC, anti-fII, anti-fX i anti-fXI.

Zaobserwowano, iż w próbkach osocza obecne były wszystkie cztery czynniki krzepnięcia (APC, trombina, czynnik Xa i czynnik XIa) o czym świadczą otrzymane sygnały od każdego przeciwciała (kolor zielony). Wyniki wykazały także, że enzymy te mogą być wyznakowane w osoczu za pomocą otrzymanych selektywnych ABPs: P-SMA172, P-SMII222, P-SMX152 i P-SMXI52 (kolor czerwony). Poprawność znakowania markerów potwierdziło nakładanie się ich sygnałów z prążkami odpowiadającymi przeciwciałom. P-SMA172 związał się z APC w osoczu już przy najniższym zastosowanym stężeniu markera (1 μM) i utrzymywał swoją selektywność do 10 μM . Przy stężeniu markera równym 20 μM zauważono niewielki dodatkowy sygnał między 25, a 35 kDa. Po inkubacji P-SMII222 z osoczem zaobserwowano silny prążek odpowiadający trombinie. Znakowanie trombiny utrzymywało swoją selektywność nawet przy bardzo wysokim stężeniu markera (20 μM). Ponadto zauważono, że P-SMX152 znakował głównie czynnik Xa, chociaż przy wyższych stężeniach (10 μM i 20 μM) wykazywał pewną aktywność krzyżową z innym białkiem, co sugeruje, że dobór odpowiedniego stężenia tego markera jest kluczowy dla osiągnięcia selektywności w detekcji czynnika Xa w ludzkim osoczu. W przypadku P-SMXI52 zaobserwowano wyraźny sygnał rozpoczynając od 2 μM ABP, który pozostał selektywny nawet przy wysokim stężeniu markera (20 μM). Otrzymane wyniki pokrywają się z badaniami na oczyszczonych enzymach i potwierdzają możliwość zastosowania wszystkich zsyntetyzowanych fluorescencyjnych markerów chemicznych do selektywnego znakowania aktywności APC, trombiny, czynnika Xa i czynnika XIa w ludzkim osoczu.

Znakowanie czynników krzepnięcia w ludzkim osoczu



Rysunek 38. Znakowanie czynników krzepnięcia (APC, trombina, czynnik Xa, czynnik XIa) w ludzkim osoczu. W optymalizacji stężenia markerów ludzkie osocze inkubowano z każdym fluorescencyjnym ABP oddzielnie przy różnych stężeniach markera w zakresie od 1 do 20 μM przez 60 minut w temperaturze 37°C. Próbkę następnie poddawano analizie SDS-PAGE i Western blot, obecność czynników krzepnięcia potwierdzono odpowiednimi przeciwciałami, a membrany detektowano za pomocą Azure Biosystems Sapphire Biomolecular Imager w następujący sposób: APC przy 658 nm (detekcja Cy5) i 488 nm (detekcja przeciwciała), trombinę przy 784 nm (detekcja Cy7) i 658 nm (detekcja przeciwciała), czynnik Xa przy 520 nm (detekcja Cy3) i 658 nm (detekcja przeciwciała), czynnik XIa przy 488 nm (detekcja BODIPY) i 658 nm (detekcja przeciwciała). Przedstawione dane odzwierciedlają co najmniej trzy oddzielne eksperymenty biologiczne.

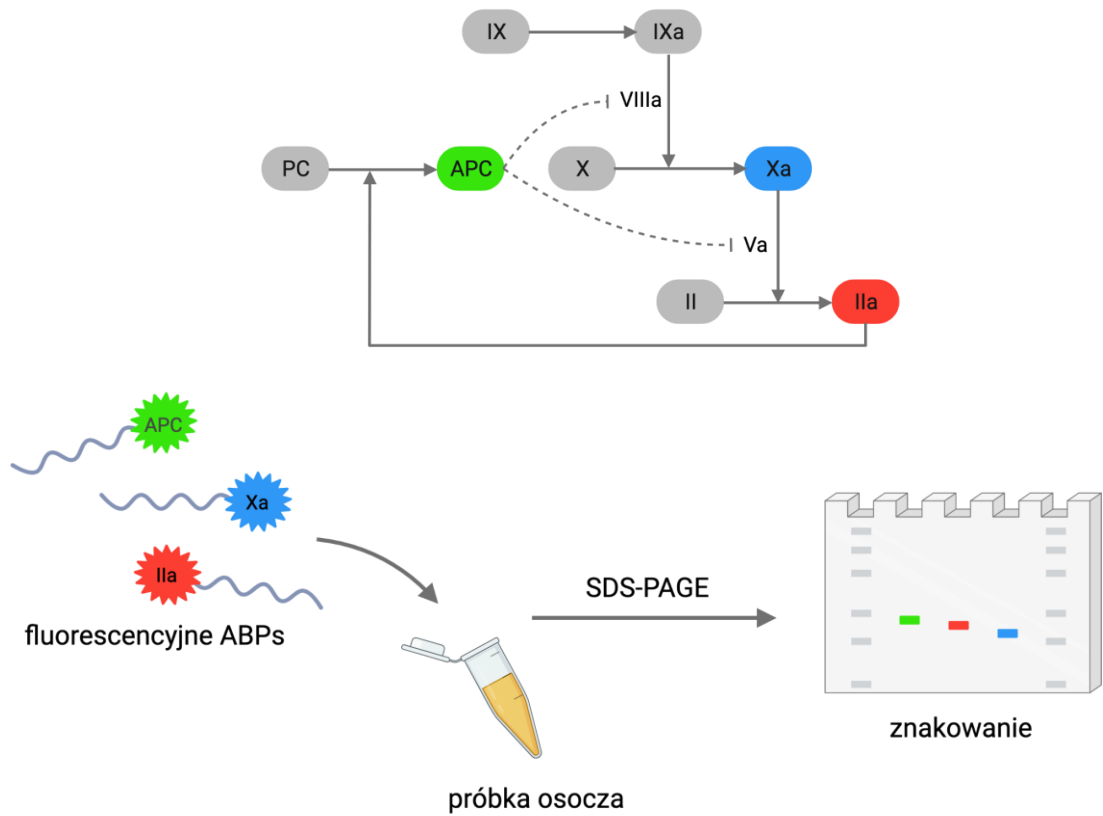
3.5.2. Jednoczesne znakowanie APC, trombiny i czynnika Xa w ludzkim osoczu

Wszystkie czynniki oraz związki biorące udział w ścieżce koagulacyjnej odgrywają istotną rolę w utrzymaniu równowagi między krzepnięciem, a krążeniem krwi. Równowaga ta zależy jednak głównie od aktywności trzech proteaz serynowych uczestniczących w końcowym etapie kaskady: APC, trombiny i czynnika Xa. Zachwianie naturalnie występujących poziomów tych proteaz w osoczu może prowadzić do poważnych zaburzeń, a nieprawidłową aktywność tych czynników krzepnięcia powiązano z takimi schorzeniami jak hemofilia [138], zakrzepica [139–141], rozsiane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe [142], choroba Alzheimera [47, 48], sepsa [272], udar mózgu [39, 162], nowotwory [273], stwardnienie rozsiane [46] i COVID-19 [161, 210]. Liczne role APC, trombiny i czynnika Xa zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patofizjologicznych, zwiększają znaczenie monitorowania ich aktywności w próbkach biologicznych. W wielu przypadkach jednoczesne zaburzenie równowagi tych czynników krzepnięcia może wskazywać na stan chorobowy. Dlatego, aby lepiej zrozumieć funkcje i dokładne role APC, trombiny i czynnika Xa, ich aktywność powinna być badana równocześnie.

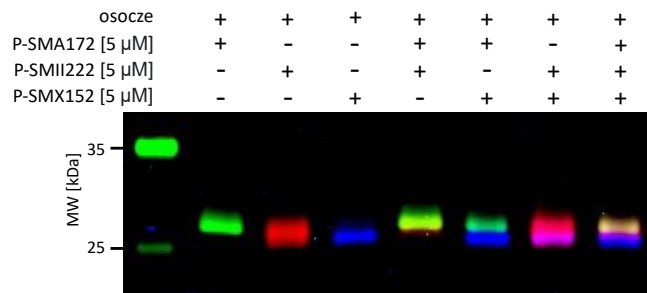
Po ustaleniu optymalnego stężenia markerów wymaganego do selektywnego znakowania APC, trombiny i czynnika Xa (5 μ M każdego z markerów: P-SMA172, P-SMII222 i P-SMX152), w kolejnym eksperymencie ludzkie osocze inkubowano nie tylko z pojedynczymi markerami, ale także z mieszaniną tych trzech ABPs w różnych konfiguracjach (pojedynczo, parami, wszystkie trzy jednocześnie). Otrzymane próbki poddano analizie SDS-PAGE, a następnie bezpośredniej wizualizacji czynników w żelu. Otrzymano trzy wyraźne i selektywne prążki reprezentujące każdy z trzech czynników krzepnięcia osobno jak i ich mieszaninę ostatecznie potwierdzając skuteczność zsyntetyzowanych fluorescencyjnych markerów chemicznych (Rysunek 39).

Zaprezentowane badania na ludzkim osoczu z wykorzystaniem zsyntetyzowanych fluorescencyjnych markerów chemicznych stanowią szybką i prostą metodę pomiaru aktywności APC, trombiny i czynnika Xa. W przyszłości markery te mogą być stosowane jako narzędzia diagnostyczne, zostać wykorzystane w badaniach osocza pacjentów celem wizualizacji poziomu czynników krzepnięcia i ułatwić wybór odpowiedniej terapii w takich zaburzeniach jak zakrzepica, udar, sepsa i wielu innych.

A



B



Rysunek 39. Jednoczesne znakowanie czynników krzepnięcia (APC, trombina, czynnik Xa) w ludzkim osoczu. (A) Graficzny schemat metodologii zastosowanej do jednoczesnego znakowania czynników krzepnięcia w ludzkim osoczu. (B) Jednoczesne znakowanie czynników krzepnięcia w ludzkim osoczu. Ludzkie osocze inkubowano z 5 μ M każdego ABP znakowanego fluorescencyjnie i poddano analizie SDS-PAGE. Bezpośrednia detekcja czynników krzepnięcia w żelu została przeprowadzona przy 520 nm dla Cy3, 658 nm dla Cy5 i 784 nm dla Cy7 przy użyciu Azure Biosystems Sapphire Biomolecular Imager. Przedstawione dane odzwierciedlają co najmniej trzy oddzielne eksperymenty biologiczne.

4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE

Hemostaza to dynamiczny proces utrzymywania zamkniętego układu krążenia, w którym uszkodzone naczynie krwionośne jest naprawiane przez bogaty w fibrynę skrzep płytkowo-włóknikowy w celu spowolnienia i zatrzymania krwawienia [274]. Kaskada krzepnięcia jest niezbędna do utrzymania skutecznej hemostazy, ponieważ rozpoczyna proces naprawy uszkodzonego śródbłonka i zapobiega samoistnemu krwawieniu. Ten skomplikowany proces obejmuje kilka reakcji, w których proteazy serynowe odgrywają najistotniejszą rolę. APC, trombina i czynnik Xa to enzymy zależne od witaminy K uczestniczące w końcowym etapie ścieżki koagulacyjnej [15, 16, 82]. Obniżona lub podwyższona aktywność jednego z tych czynników lub kilku jednocześnie może prowadzić do takich zagrażających życiu chorób, jak hemofilia [138, 157], zakrzepica [139, 140] i rozsiane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe [142]. Obniżenie stężenia APC stwierdzono u pacjentów z poinfekcyjnym udarem niedokrwiennym [39, 141] i sepsą [160]. Zwiększone wytwarzanie trombiny wykazano w patogenezie stwardnienia rozsianego [46] i chorobie Alzheimera [47, 48]. Ponadto aktywność trombiny przyczynia się do udaru mózgu [162] i jest związana z progresją nowotworów [273]. Ostatnie badania wskazują też na możliwość zastosowania inhibitorów trombiny i czynnika Xa w leczeniu pacjentów z COVID-19 [161, 210]. Inną proteazą serynową zaangażowaną w kaskadę krzepnięcia, która w ostatnich latach zyskała wiele uwagi jest czynnik XIa. Enzym ten odbiega strukturalnie od wcześniej wspomnianych proteaz zależnych od witaminy K (APC, trombiny i czynnika Xa). Czynnik XIa jest częścią szlaku wewnątrzpo pochodnego i znajduje się na wczesnym etapie kaskady krzepnięcia, przez co jego znaczenie w utrzymaniu prawidłowej hemostazy jest ograniczone [143, 144]. Ostatnie badania kliniczne wskazują jednak, że podwyższona aktywność czynnika XIa wiąże się ze zwiększonym ryzykiem niedokrwiennego udaru mózgu [133, 227], zakrzepicy żył głębokich [228, 229] i zawału serca [230]. Dane te sugerują, że czynnik XIa odgrywa ważną rolę w chorobach zakrzepowo-zatorowych, które są główną przyczyną śmiertelności i odpowiadają za jeden na cztery zgony na całym świecie [145]. Liczne role APC, trombiny, czynnika Xa i XIa w procesach fizjologicznych, jak i patofizjologicznych, zwiększają znaczenie monitorowania ich aktywności w próbkach biologicznych jako markerów farmakodynamicznych i diagnostyczno-prognostycznych. **Dlatego celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie zestawu selektywnych narzędzi chemicznych, umożliwiających szybkie i proste wykrywanie aktywności i znakowanie tych czterech enzymów w tak złożonym układzie jak ludzkie osocze.**

Od wczesnych lat 80-tych XX wieku profile specyficzności substratowej APC, trombiny, czynnika Xa i XIa określano na podstawie sekwencji ich fizjologicznych substratów [71, 82, 167, 168, 233, 234], przy użyciu różnych technik, w tym PS-SCL [71], „phage display” [170], wykorzystując chromogeniczne substraty peptydowe [169, 170] oraz na podstawie struktur krystalicznych domen katalitycznych tych enzymów [134, 151, 174]. Uzyskane w ten sposób profile specyficzności substratowej opierały się wyłącznie na naturalnych aminokwasach, co znacznie ograniczyło rozwój selektywnych narzędzi chemicznych zdolnych do rozróżniania czynników krzepnięcia między sobą. Dodatkowo badania te wykazały, że wszystkie cztery proteazy oddziaływały prawie wyłącznie z dodatnio naładowaną resztą argininy w pozycji P1 sprawiając, iż zaprojektowanie selektywnych sekwencji peptydowych stanowiło dodatkowe wyzwanie. Aby rozwiązać ten problem, w niniejszej rozprawie doktorskiej zastosowano zdefiniowaną bibliotekę (P1) oraz technologię HyCoSuL (P4-P2) [88] w celu dokładnego profilowania preferencji substratowych czynników krzepnięcia. Główną zaletą tego podejścia było wykorzystanie dużej puli nienaturalnych aminokwasów, co pozwoliło na szerszą eksplorację przestrzeni chemicznej w pozycjach P4-P1 i na pokrycie wielu oddziaływań między kieszeniami centrum aktywnego enzymów, a substratami.

Otrzymane wyniki dotyczące preferencji substratowej APC, trombiny, czynnika Xa i czynnika XIa w pozycji P1 były zgodne z wcześniejszymi badaniami. Wszystkie cztery enzymy preferencyjnie hydrolizowały wiązania peptydowe po zasadowej reszcie L-Arg. Przeprowadzone badania kinetyczne z użyciem biblioteki HyCoSuL wykazały, że w kieszeni APC S2 najlepiej rozpoznawanym naturalnym aminokwasem była L-Lys, a do selektywnych nienaturalnych aminokwasów należała hydrofobowa reszta L-Igl. W przypadku trombiny w celu uzyskania selektywności i zmniejszenia aktywności krzyżowej z innymi proteazami do konstrukcji substratów użyto dwóch pochodnych proliny (L-Aze i L-Pip). Czynniki Xa można było odróżnić od reszty enzymów za pomocą nienaturalnych aminokwasów, takich jak L-Bta i L-1-Nal. Najbardziej preferowanymi resztami aminokwasowymi w przypadku czynnika XIa były te z dużą grupą benzyłową, przy czym L-His(Bzl) i L-Glu(Bzl) były najlepsze pod względem selektywności. W przypadku kieszeni S3, APC, trombina i czynniki Xa wykazywały podobne preferencje substratowe w stosunku do naturalnych aminokwasów. APC odróżniono od trombiny i czynnika Xa poprzez wbudowanie w strukturę substratów nienaturalnego L-Dab(Z). W przypadku trombiny wybrano pochodne cysteiny, z czego L-Cys(MeBzl) okazała się być

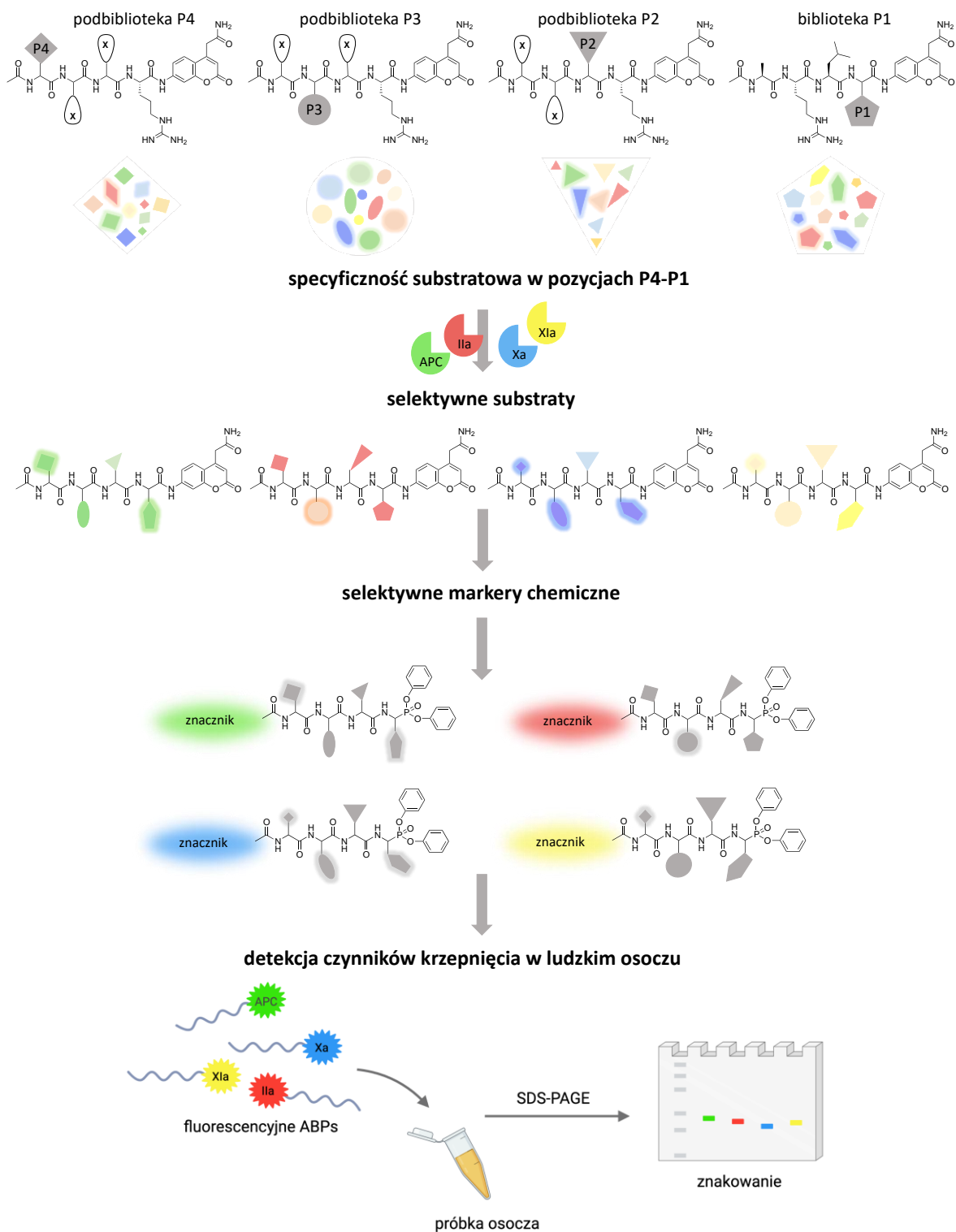
najlepsza. Preferencja czynnika Xa względem pochodnej argininy wydłużonej o jedną grupę metylenową L-hArg odróżniała ten czynnik od APC i trombiny. Kieszeń S3 czynnika XIa znacząco różniła się od kieszeni APC, trombiny i czynnika Xa, a wybór L-Nle i L-Dht zwiększył selektywność otrzymanych struktur. W pozycji P4 w przypadku APC to naturalna reszta L-Lys okazała się być najbardziej selektywna, a nienaturalnie reszta L-hCha pozwoliła na uzyskanie pożądanej selektywności substratów trombiny. Dla czynnika Xa w pozycji P4 najbardziej preferowanym aminokwasem była L-Met, jednak resztą rozpoznawaną wyłącznie przez czynnik Xa była D-Pro. W przypadku czynnika XIa to pochodna tyrozyny L-Tyr(2,6-Cl₂-Z) okazała się być selektywna.

Dysponując bardzo szczegółowym obrazem specyficzności substratowej miejsc aktywnych czterech czynników krzepnięcia (APC, trombiny, czynnika Xa i czynnika XIa) dla każdej proteazy wybrano reszty aminokwasowe preferowane tylko przez ten enzym i zsyntetyzowano serię fluorogenicznych tetrapeptydów, które następnie zbadano pod kątem ich selektywności. Wykorzystując nienaturalne aminokwasy otrzymano SMA5 (Ac-Lys-Dab(Z)-Igl-Arg-ACC), najlepszy substrat APC z dotychczas opisanych w literaturze. Ponieważ celem było stworzenie najbardziej selektywnej struktur, uzyskano substrat SMA17 (Ac-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg-ACC), który wykazywał bardzo wysoki stosunek selektywności k_{kat}/K_M . Najbardziej selektywnym substratem uzyskanym dla trombiny był SMII22 (Ac-hCha-Cys(MeBzl)-Pip-Arg-ACC), a dla czynnika Xa SMX15 (Ac-DPro-hArg-1-Nal-Arg-ACC). Natomiast dla czynnika XIa znaleziono dwa selektywne tetrapeptydy (SMXI5, Ac-Tyr(2,6-Cl₂-Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg-ACC i SMXI19, Ac-Tyr(2,6-Cl₂-Z)-Dht-His(Bzl)-Arg-ACC). Do tej pory nie znaleziono tak selektywnych substratów dla czynników krzepnięcia, które wykorzystać można do badań kinetycznych nad aktywnością tych enzymów, a struktury opisane w tej pracy wypełniają tę lukę. Dodatkowo substraty te mogą być łatwo przekształcone w inhibitory i markery chemiczne, co również zaprezentowano w niniejszej rozprawie.

W kolejnym etapie zsyntetyzowano serię czterech fluorescencyjnych markerów chemicznych: P-SMA172 (Cy5-6-Ahx-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg^P(OPh)₂) dla APC, P-SMII222 (Cy7-6-Ahx-hCha-Cys(MeBzl)-Pip-Arg^P(OPh)₂) dla trombiny, P-SMX152 (Cy3-6-Ahx-DPro-hArg-1-Nal-Arg^P(OPh)₂) dla czynnika Xa oraz P-SMXI52 (BODIPY-PEG(4)-Tyr(2,6-Cl₂-Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg^P(OPh)₂) dla czynnika XIa. Takie fluorescencyjne ABPs mogą zostać wykorzystane do **bezpośredniej detekcji czynników krzepnięcia w żelu**,

co daje im przewagę nad dotychczas otrzymanymi markerami aktywowanymi enzymatycznie [162, 275–277]. Dodatkowo, wykorzystując te same fragmenty peptydowe zsyntetyzowano także zestaw kowalencyjnych inhibitorów (I-SMA17 (Ac-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg^P(OPh)₂) dla APC, I-SMII22 (Ac-hCha-Cys(MeBzl)-Pip-Arg^P(OPh)₂) dla trombiny, I-SMX15 (Ac-DPro-hArg-1-Nal-Arg^P(OPh)₂) dla czynnika Xa oraz I-SMXI5 (Ac-Tyr(2,6-Cl₂-Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg^P(OPh)₂) dla czynnika XIa). Selektyność fluorescencyjnych markerów i inhibitorów sprawdzono za pomocą badań kinetycznych oraz analizy SDS-PAGE wykorzystując oczyszczone czynniki krzepnięcia. Otrzymane wyniki potwierdziły selektyność wszystkich zaprojektowanych narzędzi chemicznych. Selektyność markerów dedykowanych APC, czynnikowi Xa i XIa jest szczególnie istotna, ponieważ trombina ma ogólną tendencję do bycia bardziej aktywną proteazą [151]. Brak selektyności tych ABPs mógłby zaburzać interpretacje wyników i prowadzić do błędnych wniosków co do aktywności czynników krzepnięcia w próbkach biologicznych. W ostatnim etapie badań sprawdzono przydatność zaprojektowanych markerów chemicznych w detekcji czynników krzepnięcia w ludzkim osoczu, złożonym kompleksie biologicznym, w którym obecnych jest wiele białek oraz wszystkie czynniki krzepnięcia [16, 191]. Zaobserwowano cztery wyraźne i selektywne sygnały, odpowiadające każdej badanej proteazie co potwierdzone zostało przeciwciałami. Znakując czynniki krzepnięcia w osoczu ostatecznie zweryfikowano i potwierdzono możliwość zastosowania fluorescencyjnych ABPs w układzie biologicznym oraz przedstawiono pierwszy takiego typu zestaw markerów do jednoczesnego obrazowania aktywności czynników krzepnięcia.

Podsumowując, w niniejszej dysertacji określono specyficzność substratową APC, trombiny, czynnika Xa i XIa w pozycjach P4-P1. Opracowano zestaw selektywnych narzędzi chemicznych, takich jak: substraty, inhibitory, biotynylowane i fluorescencyjne markery chemiczne do badania aktywności tych proteaz. Zaprojektowane fluorescencyjne ABPs pozwoliły na szybką, bezpośrednią i jednoczesną detekcję czynników krzepnięcia w ludzkim osoczu i mogą zostać następnie wykorzystane do wizualizacji i porównania poziomu APC, trombiny oraz czynników Xa i XIa w próbkach fizjologicznych i patofizjologicznych. Zdolność fluorescencyjnych ABPs do selektywnego znakowania czynników krzepnięcia jest wyjątkowo istotna, ponieważ proteazy te służą jako markery prognostyczne wielu zaburzeń. W przyszłości otrzymane ABPs mogą być zastosowane jako narzędzia diagnostyczne i ułatwiać wybór odpowiedniej terapii w przypadku takich chorób jak zakrzepica, udar niedokrwienny mózgu, sepsa, choroba Alzheimera i wielu innych.



Rysunek 40. Schemat przedstawiający najważniejsze osiągnięcia niniejszej rozprawy doktorskiej w postaci strategii projektowania selektywnych narzędzi chemicznych do wizualizacji czynników krzepnięcia krwi w ludzkim osoczu za pomocą metody HyCoSuL.

5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

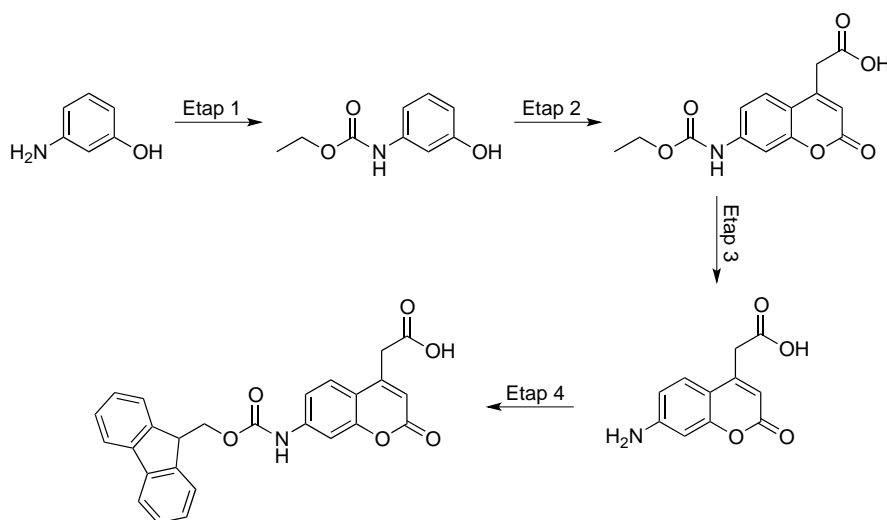
Wszystkie odczynniki do syntezy substratów, inhibitorów i markerów chemicznych zakupione zostały u komercyjnych dostawców i użyte bez dalszego oczyszczania. Żywica amidowa typu Rink Amide RA (rozmiar ziaren 200-300 μm , stopień podstawienia 0,74 mmol/g, dla substratów znakowanych ACC), żywica 2-chlorotrytylowa (rozmiar ziaren 100-200 μm , stopień podstawienia 1,60 mmol/g, dla peptydów dalej przekształczanych do inhibitorów i markerów), Fmoc-6-Ahx-OH, Fmoc-PEG(4)-OH, biotyna, *N,N'*-diizopropylkarbodiimid (DICl, do syntezy peptydów), piperodyna (PIP, do syntezy peptydów), *O*-benzotriazol-(*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowy) heksafluorofosforan (HBTU, do syntezy peptydów), *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy heksafluorofosforan (HATU, do syntezy peptydów) i kwas trifluorooctowy (TFA, czystość 99%) zakupiono z firmy Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Niemcy). Fmoc-blokowane aminokwasy (czystość > 98%) zostały zakupione od różnych dostawców: Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Niemcy), Creosalus (Louisville, KY, USA), Bachem (Torrance, CA, USA) i P3 BioSystems (Louisville, KY, USA). P_2O_5 (pentatlenek difosforu, czystość 98%) pochodził z firmy Avantor (Gliwice, Polska). *N*-hydroksybenzotriazol (HOBt, czystość > 98%) zakupiono z firmy Creosalus. 2,4,6-trimetylopirodyna (2,4,6-kolidyna, do syntezy peptydów), 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) i triizopropylsolan (TIPS, czystość 99%) zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich (Poznań, Polska). *N,N*-diizopropyl-oetyloamina (DIPEA, do syntezy peptydów) otrzymano z firmy VWR International (Gdańsk, Polska). Następujące rozpuszczalniki zostały zakupione w firmie Avantor: dichlorometan (DCM, czysty do analizy), *N,N'*-dimetyloformamid (DMF, do syntezy peptydów), eter dietylowy (Et_2O , czysty do analizy), metanol (MeOH, czysty do analizy), acetonitryl (ACN, czysty do HPLC) i AcOH (kwas octowy, czystość 99%). Znaczniki fluorescencyjne (Cy3-NHS, Cy5-NHS, Cy7-NHS, BODIPY FL NHS) zostały zakupione z firmy Lumiprobe GmbH (Hannover, Niemcy). Przeciwciało anti-PC (kurze, poliklonalne, ABIN597333) otrzymano z firmy Antibodies-online GmbH (Aachen, Niemcy). Przeciwciała anti-fII (owcze, poliklonalne, PAHFII-S), anti-fX (owcze, poliklonalne, PAHFX-S) i anti-fXI (owcze, poliklonalne, PAHFXI-S) pochodziły z firmy Haematologic Technologies Inc. (Essex Junction, VT, USA).

Indywidualne substraty, inhibitory i markery chemiczne oczyszczono za pomocą HPLC (pompa Waters M600, detektor Waters M2489, półpreparatywna kolumna Wide Pore

C8 Discovery, Waters sp z.o.o., Warszawa, Polska) w układzie rozpuszczalników: faza A (woda:0,1% TFA) i faza B (acetonitryl:0,1% TFA). Czystość każdego z otrzymanych związków potwierdzono za pomocą HPLC z zastosowaniem kolumny analitycznej Discovery Bio Wide Pore C8 w układzie rozpuszczalników: faza A (woda:0,1% TFA) i faza B (acetonitryl:0,1% TFA); gradient od 95% A do 5% A w czasie 15 minut. Czystość wszystkich związków wynosiła $\geq 95\%$. Masę cząsteczkową każdego związku potwierdzono przy użyciu wysokorozdzielczej spektrometrii mas na urządzeniu WATERS LCT premier XE wyposażonym w źródło jonizacji ESI (ang. *electrospray ionization*) oraz analizator czasu przelotu TOF (ang. *time-of-flight*).

5.1. Synteza znacznika fluorogenicznego Fmoc-ACC-OH

Syntezę fluorogenicznej grupy reporterowej, ACC (7-amino-4-karbamoilometylokumaryna), przeprowadzono zgodnie z metodą wielkoskalową opisaną przez Mały'ego i współpracowników [81]. Ogólny schemat czteroetapowej syntezy przedstawiono na Rysunku 41.



Rysunek 41. Schemat syntezy znacznika fluorogenicznego Fmoc-ACC-OH.

5.1.1. Synteza 3-N-(karboetoksy)aminofenolu

W dwuszyjnej kolbie okrągłodennej o pojemności 2 L zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, kamyczki wrzenne i mieszadło magnetyczne umieszczono 3-aminofenol (150 g, 1,37 mola) i rozpuszczono go w 750 mL octanu etylu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia octanu etylu przez 30 minut. Następnie do kolby za pomocą

wkraplacza w ciągu godziny dodano chloromrówczan etylu (66,0 mL, 0,687 mola). Podczas wkraplania roztworu w kolbie pojawił się biały osad produktu ubocznego. Po wkropleniu całości chloromrówczanu etylu mieszaninę ogrzewano przez kolejne 30 minut, następnie wyłączono grzanie i ochłodzono do temperatury pokojowej. Biały osad, który powstał w czasie reakcji przesączono na drodze filtracji pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyto trzema porcjami octanu etylu (3 x 300 mL). Otrzymany przesącz odparowano na wyparce rotacyjnej, a powstały biały osad suszono na powietrzu do stałej masy otrzymując 111 g 3-N-(karboetoksy)aminofenolu z wydajnością 89%. Produkt użyto w kolejnym etapie bez wcześniejszego oczyszczania.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6 , 25°C): δ 1,19 (t, 3H, $J = 7,1$), 4,06 (q, 2H, $J = 7,1$), 6,30-6,38 (m, 1H), 6,75-6,82 (m, 1H), 6,95-6,99 (m, 2H), 9,29 (br s, 1H), 9,44 (s, 1H)

HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone = 182,0817, $[\text{M}+\text{H}]^+$ zmierzone = 182,0825

5.1.2. Synteza kwasu 7-N-(karboetoksy)aminokumaryno-4-octowego

Do kolby okrągłodennej o pojemności 3 L zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne dodano 1,40 L 70% kwasu siarkowego, który przez 1 godzinę chłodzono w łaźni lodowej. Następnie porcjami dodawano 3-N-(karboetoksy)aminofenol (50,0 g, 0,276 mola). Mieszaninę intensywnie mieszano z jednoczesnym chłodzeniem reakcji, a po całkowitym rozpuszczeniu 3-N-(karboetoksy)aminofenolu w ciągu godziny również porcjami dodano kwas 1,3-acetonodikarboksylowy (44,3 g, 0,303 mola). Łaźnię lodową usunięto, a reakcję prowadzono przez 10 godzin w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę wylano na rozdrobiony lód (około 2 kg) i mieszano 30 minut. Powstały osad sączono na lejku ze spiekim metodą filtracji pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie przemyto eterem dietylowym (6 x 1 L). Otrzymany osad rozpuszczono w gorącym acetonitrylu (200 mL). Po ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej osad przesączono otrzymując 52,2 g białego produktu końcowego – kwasu 7-N-(karboetoksy)aminokumaryno-4-octowego z wydajnością 65%.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6 , 25°C): δ 1,21 (t, 3H, $J = 7,1$), 3,81 (s, 2H), 4,11 (q, 2H, $J = 7,1$), 6,28 (s, 1H), 7,31-7,35 (m, 1H), 7,52-7,58 (m, 2H), 10,12 (s, 1H)

HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone = 292,0816, $[\text{M}+\text{H}]^+$ zmierzone = 292,0821

5.1.3. Synteza kwasu 7-aminokumaryno-4-octowego

W kolbie okrągłodennej o pojemności 2 L zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i kamyczki wrzenne umieszczono 466 mL wody, a następnie małymi porcjami dodano wodorotlenek sodu (71,4 g, 1,79 mola). Po jego rozpuszczeniu dodano kwas 7-*N*-(karboetoksy)aminokumaryno-4-octowy (52,2 g, 0,179 mola). Reakcję prowadzono przez 3 godziny przy użyciu kosza grzejnego w temperaturze wrzenia wody. Następnie mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej, a używając stężonego kwasu siarkowego jej pH doprowadzono do 2. W kwaśnym pH wytrącił się żółty osad kwasu 7-aminokumaryno-4-octowego, który oddzielony od roztworu został na drodze filtracji pod zmniejszonym ciśnieniem. W kolejnym etapie poprzez rekrytalizację oddzielony został także współstrącony siarczanu sodu. W tym celu kilka 20,0 g porcji suchego produkt zanieczyszczonego siarczanem sodu każdorazowo rozpuszczono w 300 mL acetonu o czystości cz.d.a., a mieszaninę ogrzewano przez 20 minut w temperaturze wrzenia acetonu. Nierozpuszczony siarczan sodu przesączono na drodze filtracji pod zmniejszonym ciśnieniem, a otrzymany żółty przesącz odparowano do sucha na wyparce rotacyjnej otrzymując ostatecznie 25,2 g kwasu 7-aminokumaryno-4-octowego z wydajnością 64%.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6 , 25°C): δ 3,73 (s, 2H), 5,97 (s, 1H), 6,16 (br s, 2H), 6,41 (d, 1H, $J = 7,1$), 6,54 (dd, 1H, $J = 8,36, 2,1$), 7,33 (d, 1H, $J = 0,7$), 12,65 (s, 1H)

HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone = 220,0610, $[\text{M}+\text{H}]^+$ zmierzone = 220,0624

5.1.4. Synteza kwasu 7-*N*-(fluorenylometoksykarbonylo)aminokumaryno-4-octowego

Do kolby okrągłodennej o pojemności 1 L zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne dodano kwas 7-amino-aminokumaryno-4-octowy (10,0 g, 45,6 mmola), 75 mL dichlorometanu oraz DIPEA (17,5 mL, 0,100 mola). Mieszaninę ochłodzono w łaźni lodowej i mieszano przez 15 minut. Następnie do mieszaniny dodano TMSCl (13,0 mL, 0,100 mola). Łażnię lodową zastąpiono łaźnią wodną, a mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 3 godziny. Po tym czasie mieszaninę ochłodzono w łaźni lodowej do temperatury 5°C i porcjami dodano Fmoc-Cl (13,0 g, 50,0 mmola). Następnie łaźnię lodową usunięto, a reakcję prowadzono przez kolejne 11 godzin w temperaturze pokojowej. Po tym czasie do mieszaniny dodano 250 mL metanolu i mieszano przez 30 minut. Powstały biały osad zebrano na drodze filtracji pod zmniejszonym ciśnieniem, przemyto 2-krotnie

metanolem (2 x 100 mL), eterem dietylowym (2 x 100 mL) i suszono na powietrzu do stałej masy otrzymując 16,2 g kwasu 7-*N*-(fluorenylometoksykarbonylo)aminokumaryno-4-octowego (Fmoc-ACC-OH) z wydajnością 81%. Czteroetapową syntezę znacznika fluorogenicznego powtórzono jeszcze kilkakrotnie otrzymując ostatecznie około 150 g Fmoc-ACC-OH. Czystość otrzymanego związku potwierdzono za pomocą HPLC analitycznego i wyniosła ona $\geq 90\%$.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6 , 25°C): δ 3,86 (s, 2H), 4,33 (t, 1H, $J = 6,2$), 4,55 (d, 2H, $J = 6,2$), 6,34 (s, 1H), 7,33-7,44 (m, 5H), 7,56 (s, 1H), 7,61 (d, 1H, $J = 8,6$), 7,76 (d, 2H, $J = 7,3$), 7,91 (d, 2H, $J = 7,4$), 10,23 (s, 1H), 12,84 (s, 1H)

HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone = 442,1291, $[\text{M}+\text{H}]^+$ zmierzone = 442,1292

5.2. Synteza zdefiniowanej biblioteki Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC oraz biblioteki kombinatorycznej HyCoSuL P1-Arg

Zdefiniowana biblioteka Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC oraz biblioteka kombinatoryczna z L-Arg w pozycji P1 zsyntezowane zostały wcześniej w laboratorium prof. Marcina Drąga w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania według opracowanego protokołu [58, 88, 93].

5.3. Badanie aktywności czynników krzepnięcia krwi wobec bibliotek substratów fluorogenicznych

APC, trombina, czynniki Xa i XIa otrzymano dzięki współpracy z prof. Jamesem Huntingtonem (Department of Haematology, Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge). Białka oczyszczono ze świeżo mrożonego osocza. Protrombina i czynnik X zostały oczyszczone zmodyfikowaną metodą Bajzara i współpracowników [278], a białko C zgodnie ze zmodyfikowaną metodą opisaną przez Kisiela [279]. Czynnik XI wyekspresjonowano zgodnie ze zmodyfikowanym protokołem opisanym w literaturze [284]. Trombinę otrzymano przez aktywację protrombiny jadem węża *Echis Carinatus* [280]. Czynnik X aktywowano do czynnika Xa używając jadu żmii Russella [281], a aktywowane białko C (APC) otrzymano przy użyciu trombiny w kompleksie z trombomoduliną [282]. Czynnik XIa otrzymano przez aktywację czynnika XI używając

czynnika XIIIa [284]. Czystość białek potwierdzono przy użyciu elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) zgodnie z protokołem opisanym przez Laemmli [283].

Wszystkie badania kinetyczne przeprowadzono w buforze do pomiaru aktywności enzymatycznej (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7,4) w temperaturze 37°C przy użyciu spektrofluorometru (Molecular Devices SpectraMax Gemini XPS) na białych płytkach 96-dołkowych (Corning®).

Do określenia specyficzności substratowej APC, trombiny, czynników Xa i XIa w pozycji P1 wykorzystano zdefiniowaną bibliotekę o ogólnej strukturze Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC zawierającą 133 indywidualne substraty fluorogeniczne [93]. Warunki oznaczania specyficzności substratowej były następujące: 1 µL każdego substratu z biblioteki umieszczano w jednym dołku i dodawano 99 µL preinkubowanego enzymu (15 minut, 37°C). Końcowe stężenie biblioteki wynosiło 200 µM, a enzymu 75 nM dla APC, 9 nM dla trombiny, 21 nM dla czynnika Xa i 8 nM dla czynnika XIa.

Profile specyficzności substratowej APC, trombiny, czynników Xa i XIa w kieszeniach S4-S2 określono przy użyciu biblioteki HyCoSuL P1-Arg zawierającej ponad 100 naturalnych i nienaturalnych aminokwasów w każdej z trzech podbibliotek (P4, P3 i P2) [58, 88]. Skan biblioteki HyCoSuL przeprowadzono następująco: 1 µL każdego substratu umieszczono w jednym dołku i dodano 99 µL preinkubowanego enzymu w buforze (15 minut, 37°C), końcowe stężenie biblioteki wynosiło 100 µM, a końcowe stężenie enzymu 40 nM dla APC, 1 nM dla trombiny, 5 nM dla czynnika Xa i 8 nM dla czynnika XIa.

Hydroлизę substratów monitorowano przez 30 minut przy długości fali wzbudzenia $\lambda = 355$ nm i długości fali emisji $\lambda = 460$ nm. Do analizy postępu reakcji wzięto tylko liniową część każdego wykresu i odczytano wartość RFU/s (ang. *relative fluorescence unit* – jednostka względnej fluorescencji w czasie). Profile specyficzności substratowej wyznaczono zakładając najlepiej rozpoznawany aminokwas z najwyższą wartość RFU/s jako 100%, a pozostałe elementy biblioteki przyrównując odpowiednio. Każdy pomiar powtarzano co najmniej 2-krotnie, a dane przedstawiono jako wartość średnią z tych powtórzeń. Uzyskane wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania SoftMax (Molecular Devices), GraphPad Prism i Microsoft Excel.

5.4. Synteza zdefiniowanych substratów dla proteaz serynowych uczestniczących w ścieżce koagulacyjnej

Zaprojektowane dla każdego enzymu substraty zsyntetyzowano na żywicy amidowej typu Rink Amide RA metodą syntezy peptydów na podłożu stałym (SPPS) [81] z wykorzystaniem ACC jako grupy reporterowej oraz Fmoc-blokowanych aminokwasów. W pierwszym kroku 10,0 g żywicy umieszczano w szklanym reaktorze do syntezy peptydów i spulchniano w DCM przez 30 minut. *N*-końcową grupę blokującą Fmoc usunięto przy użyciu 20% piperydyny w DMF (5, 5 i 25 minut) następnie żywicę przemyto dokładnie DMF (6-krotnie), a usunięcie grupy Fmoc potwierdzono testem ninhydrynowym. Fmoc-ACC-OH (2,5 ekwiwalenta, 8,16 g) aktywowano przy użyciu HOBt (2,5 ekwiwalenta, 2,77 g) oraz DICl (2,5 ekwiwalenta, 2,40 mL) w DMF, a następnie roztwór dodano do żywicy, a reaktor umieszczono na wytrząsarce kołyskowej i delikatnie mieszano. Po 24 godzinach roztwór usunięto, żywicę przemyto DMF (3-krotnie), a reakcję powtórzono stosując 1,5 ekwiwalenta wszystkich powyższych odczynników w celu zwiększenia wydajności sprzęgania Fmoc-ACC-OH. Po usunięciu grupy Fmoc, żywicę przemyto 6-krotnie DMF i przyłączono aminokwas w pozycji P1, Fmoc-Arg(Pbf)-OH (3 ekwiwalenty, 14,4 g) stosując jako odczynniki sprzęgające HATU (3 ekwiwalenty, 8,44 g) i 2,4,6-kolidynę (3 ekwiwalenty, 2,93 mL) w DMF. Po upływie 24 godzin żywicę przemyto 3-krotnie DMF i reakcję powtórzono z użyciem 1,5 ekwiwalenta powyższych reagentów. Następnie usunięto grupę blokującą Fmoc w sposób opisany powyżej i potwierdzano deprotekcję testem ninhydrynowym. Żywicę przemyto DMF (6-krotnie), DCM (3-krotnie), MeOH (3-krotnie) i umieszczono w próżni w obecności P₂O₅ na noc w celu dokładnego wysuszenia. Wysuszoną żywicę podzielono na 94 porcje (po 100 mg każda) i umieszczono w wielodołkowym reaktorze do syntezy peptydów. Następnie do każdej z porcji żywicy dodawano odpowiednie aminokwasy Fmoc-P2-OH (2,5 ekwiwalenta), HOBt (2,5 ekwiwalenta, 28,0 mg) i DICl (2,5 ekwiwalenta, 24,0 µL) w DMF, a reakcję sprzęgania prowadzono przez 2,5 godziny. Po usunięciu grupy Fmoc, aminokwasy P3 i P4 przyłączano do żywicy za pomocą HOBt (2,5 ekwiwalenta, 28,0 mg) i DICl (2,5 ekwiwalenta, 24,0 µL) w DMF w 2,5-godzinnych cyklach. Po każdym sprzęganiu aminokwasów i usuwaniu grupy Fmoc przeprowadzono test ninhydrynowy. *N*-koniec peptydów zabezpieczono poprzez reakcję acetylacji przy użyciu AcOH (5 ekwiwalentów, 21,0 µL), HBTU (5 ekwiwalentów, 140 mg) i DIPEA (5 ekwiwalentów, 64,0 µL) w DMF. Po 1 godzinie żywicę przemyto DMF (6-krotnie), DCM (3-krotnie), MeOH (3-krotnie)

i wysuszono w obecności P₂O₅. Hydrolizę peptydów z żywicy przeprowadzono przy użyciu mieszaniny TFA/TIPS/H₂O (% , v/v/v, 95:2,5:2,5). Peptydy wytrącone w Et₂O i oczyszczono przy pomocy HPLC półpreparatywnego. Czystość substratów potwierdzono za pomocą HPLC analitycznego, a masę cząsteczkową poprzez analizę ESI-MS (Tabela 9, 10, 11, 12). Związki następnie zliofilizowano, rozpuszczono w DMSO do końcowego stężenia równego 10 mM i przechowywano w temperaturze -80°C aż do użycia.

Tabela 9. Wyniki analizy ESI-MS i czystości substratów APC.

	Struktura	[M+H]⁺²⁺ obliczone	[M+H]⁺²⁺ zmierzone	Czystość
SMA1	Ac-Lys-Dab(Z)-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	1075,4768	1075,4773	≥ 99%
SMA2	Ac-Lys-Agp-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	969,4462	969,4442	≥ 99%
SMA3	Ac-Lys-Glu(Bzl)-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	1060,4659	1060,4678	≥ 97%
SMA4	Ac-Lys-Nle(O-Bzl)-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	1060,5023	1060,5031	≥ 99%
SMA5	Ac-Lys-Dab(Z)-Igl-Arg-ACC	952,4681	952,4676	≥ 99%
SMA6	Ac-Lys-Agp-Igl-Arg-ACC	846,4375	846,4381	≥ 99%
SMA7	Ac-Lys-Glu(Bzl)-Igl-Arg-ACC	937,4572	937,4589	≥ 99%
SMA8	Ac-Lys-Nle(O-Bzl)-Igl-Arg-ACC	937,4936	937,4934	≥ 99%
SMA9	Ac-Lys-Dab(Z)-Val-Arg-ACC	878,4525	878,4521	≥ 99%
SMA10	Ac-Lys-Agp-Val-Arg-ACC	772,4218	772,4213	≥ 95%
SMA11	Ac-Lys-Glu(Bzl)-Val-Arg-ACC	863,4416	863,4434	≥ 95%
SMA12	Ac-Lys-Nle(O-Bzl)-Val-Arg-ACC	863,4780	863,4785	≥ 97%
SMA13	Ac-Lys-Dab(Z)-Oic-Arg-ACC	930,4838	930,4832	≥ 97%
SMA14	Ac-Lys-Agp-Oic-Arg-ACC	412,7305	412,7392	≥ 97%
SMA15	Ac-Lys-Glu(Bzl)-Oic-Arg-ACC	915,4728	915,4732	≥ 97%
SMA16	Ac-Lys-Nle(O-Bzl)-Oic-Arg-ACC	915,5093	915,5091	≥ 95%
SMA17	Ac-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg-ACC	907,4790	907,4796	≥ 99%
SMA19	Ac-Lys-Glu(Bzl)-Lys-Arg-ACC	892,4681	892,4695	≥ 99%
SMA20	Ac-Lys-Nle(O-Bzl)-Lys-Arg-ACC	892,5045	892,5038	≥ 99%
SMA21	Ac-Lys-Dab(Z)-Cha-Arg-ACC	932,4994	932,4982	≥ 99%
SMA22	Ac-Lys-Agp-Cha-Arg-ACC	826,4688	826,4696	≥ 99%
SMA23	Ac-Lys-Glu(Bzl)-Cha-Arg-ACC	917,4885	917,4896	≥ 99%
SMA24	Ac-Lys-Nle(O-Bzl)-Cha-Arg-ACC	917,5249	917,5265	≥ 97%
SMA25	Ac-Lys-Glu(All)-Igl-Arg-ACC	887,4416	887,4402	≥ 99%
SMA26	Ac-Lys-βhLys-Igl-Arg-ACC	860,4783	860,4785	≥ 99%
SMA54	Ac-Lys-Gln-Lys-Arg-ACC	801,4371	801,4374	≥ 99%

Tabela 10. Wyniki analizy ESI-MS i czystości substratów trombiny.

	Struktura	[M+H]⁺ obliczone	[M+H]⁺ zmierzone	Czystość
SMII16	Ac-hCha-Cys(MeBzl)-Pro-Arg-ACC	888,4442	888,4429	≥ 99%
SMII17	Ac-hLeu-Cys(MeBzl)-Pro-Arg-ACC	848,4129	848,4133	≥ 99%
SMII18	Ac-2-Aoc-Cys(MeBzl)-Pro-Arg-ACC	862,4285	862,4281	≥ 99%
SMII19	Ac-hCha-Cys(MeBzl)-Aze-Arg-ACC	874,4285	874,4293	≥ 99%
SMII20	Ac-hLeu-Cys(MeBzl)-Aze-Arg-ACC	834,3973	834,3969	≥ 99%
SMII21	Ac-2-Aoc-Cys(MeBzl)-Aze-Arg-ACC	848,4129	848,4134	≥ 99%
SMII22	Ac-hCha-Cys(MeBzl)-Pip-Arg-ACC	902,4598	902,4587	≥ 99%
SMII23	Ac-hLeu-Cys(MeBzl)-Pip-Arg-ACC	862,4285	862,4279	≥ 99%
SMII24	Ac-2-Aoc-Cys(MeBzl)-Pip-Arg-ACC	876,4442	876,4443	≥ 99%
SMII25	Ac-hCha-Cys(4-MeOBzl)-Pro-Arg-ACC	904,4391	904,4390	≥ 97%
SMII26	Ac-hLeu-Cys(4-MeOBzl)-Pro-Arg-ACC	864,4078	864,4073	≥ 99%
SMII27	Ac-2-Aoc-Cys(4-MeOBzl)-Pro-Arg-ACC	878,4235	878,4227	≥ 99%
SMII28	Ac-hCha-Cys(4-MeOBzl)-Aze-Arg-ACC	890,4235	890,4224	≥ 97%
SMII29	Ac-hLeu-Cys(4-MeOBzl)-Aze-Arg-ACC	850,3922	850,3942	≥ 99%
SMII30	Ac-2-Aoc-Cys(4-MeOBzl)-Aze-Arg-ACC	864,4078	864,4067	≥ 99%
SMII31	Ac-hCha-Cys(4-MeOBzl)-Pip-Arg-ACC	918,4548	918,4554	≥ 99%
SMII32	Ac-hLeu-Cys(4-MeOBzl)-Pip-Arg-ACC	878,4235	878,4215	≥ 99%
SMII33	Ac-2-Aoc-Cys(4-MeOBzl)-Pip-Arg-ACC	892,4391	892,4382	≥ 99%
SMII34	Ac-hCha-Cys(4-MeOBzl)-Hyp(Bzl)-Arg-ACC	1010,4810	1010,4821	≥ 99%
SMII57	Ac-Chg-Cys(MeBzl)-Pip-Arg-ACC	874,4285	874,4277	≥ 99%
SMII59	Ac-Chg-Cys(MeBzl)-Hyp(Bzl)-Arg-ACC	966,4548	966,4547	≥ 97%
SMII60	Ac-2-Aoc-Cys(MeBzl)-Hyp(Bzl)-Arg-ACC	968,4704	968,4691	≥ 97%
SMII55	Ac-Nle-Lys-Pro-Arg-ACC	755,4204	755,4218	≥ 99%

Tabela 11. Wyniki analizy ESI-MS i czystości substratów czynnika Xa.

	Struktura	[M+H]⁺ obliczone	[M+H]⁺ zmierzone	Czystość
SMX1	Ac-Arg(NO ₂)-hArg-Trp-Arg-ACC	974,4709	974,4722	≥ 95%
SMX2	Ac-Gln-hArg-Trp-Arg-ACC	901,4433	901,4431	≥ 97%
SMX3	Ac-DPro-hArg-Trp-Arg-ACC	870,4375	870,4361	≥ 97%
SMX4	Ac-Arg(NO ₂)-hArg-Phe(3-Cl)-Arg-ACC	969,4210	969,4218	≥ 99%
SMX5	Ac-Gln-hArg-Phe(3-Cl)-Arg-ACC	896,3934	896,3934	≥ 99%
SMX6	Ac-DPro-hArg-Phe(3-Cl)-Arg-ACC	865,3876	865,3879	≥ 99%
SMX7	Ac-Arg(NO ₂)-hArg-Bta-Arg-ACC	991,4321	991,4320	≥ 99%
SMX8	Ac-Gln-hArg-Bta-Arg-ACC	918,4045	918,4065	≥ 97%
SMX9	Ac-DPro-hArg-Bta-Arg-ACC	887,3987	887,3996	≥ 99%
SMX10	Ac-Arg(NO ₂)-hArg-Phe-Arg-ACC	935,4600	935,4587	≥ 99%
SMX11	Ac-Gln-hArg-Phe-Arg-ACC	862,4324	862,4324	≥ 99%
SMX12	Ac-DPro-hArg-Phe-Arg-ACC	831,4266	831,4280	≥ 99%
SMX13	Ac-Arg(NO ₂)-hArg-1-Nal-Arg-ACC	985,4756	985,4747	≥ 99%
SMX14	Ac-Gln-hArg-1-Nal-Arg-ACC	912,4481	912,4468	≥ 99%
SMX15	Ac-DPro-hArg-1-Nal-Arg-ACC	881,4423	881,4412	≥ 97%
SMX61	Ac-Met-hArg-1-Nal-Arg-ACC	915,4299	915,4292	≥ 97%
SMX62	Ac-His(Bzl)-hArg-1-Nal-Arg-ACC	1011,4953	1011,4963	≥ 99%
SMX63	Ac-DPro-hArg-Gly-Arg-ACC	741,3796	741,3793	≥ 99%
SMX64	Ac-Met-hArg-Gly-Arg-ACC	775,3674	775,3679	≥ 99%
SMX65	Ac-His(Bzl)-hArg-Gly-Arg-ACC	871,4327	871,4340	≥ 99%
SMX56	Ac-Pro-Arg-Gly-Arg-ACC	727,3640	727,3647	≥ 99%

Tabela 12. Wyniki analizy ESI-MS i czystości substratów czynnika XIa.

	Struktura	[M+H]⁺ obliczone	[M+H]⁺ zmierzone	Czystość
SMXI1	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Nle-His(Bzl)-Arg-ACC	1078,4109	1078,4105	≥ 99%
SMXI2	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Phe(3-F)-His(Bzl)-Arg-ACC	1130,3859	1130,3857	≥ 99%
SMXI3	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-2-Aoc-His(Bzl)-Arg-ACC	1106,4423	1106,4424	≥ 99%
SMXI4	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-His(Bzl)-Arg-ACC	644,6829	644,6832	≥ 99%
SMXI5	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg-ACC	1070,3945	1070,3940	≥ 99%
SMXI6	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Phe(3-F)-Glu(Bzl)-Arg-ACC	1122,3695	1122,3702	≥ 99%
SMXI7	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-2-Aoc-Glu(Bzl)-Arg-ACC	1098,4259	1098,4255	≥ 95%
SMXI8	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Glu(Bzl)-Arg-ACC	1280,3417	1280,3430	≥ 99%
SMXI9	Ac-Tyr(Bzl)-Nle-His(Bzl)-Arg-ACC	1010,4888	1010,4877	≥ 99%
SMXI10	Ac-Tyr(Bzl)-Phe(3-F)-His(Bzl)-Arg-ACC	1062,4637	1062,4641	≥ 99%
SMXI11	Ac-Tyr(Bzl)-2-Aoc-His(Bzl)-Arg-ACC	1038,5201	1038,5369	≥ 99%
SMXI12	Ac-Tyr(Bzl)-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-His(Bzl)-Arg-ACC	1218,4371	1218,4377	≥ 95%
SMXI13	Ac-Tyr(Bzl)-Nle-Glu(Bzl)-Arg-ACC	1002,4725	1002,4703	≥ 99%
SMXI14	Ac-Tyr(Bzl)-Phe(3-F)-Glu(Bzl)-Arg-ACC	1054,4475	1054,4465	≥ 99%
SMXI15	Ac-Tyr(Bzl)-2-Aoc-Glu(Bzl)-Arg-ACC	1030,5038	1030,5040	≥ 99%
SMXI16	Ac-Tyr(Bzl)-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Glu(Bzl)-Arg-ACC	1210,4208	1210,4214	≥ 99%
SMXI17	Ac-Bpa-2-Aoc-His(Bzl)-Arg-ACC	1036,5045	1036,5033	≥ 99%
SMXI18	Ac-Lys(2-Cl-Z)-2-Aoc-His(Bzl)-Arg-ACC	1081,5027	1081,5011	≥ 99%
SMXI19	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Dht-His(Bzl)-Arg-ACC	1153,4218	1153,4213	≥ 99%
SMXI20	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Cha-His(Bzl)-Arg-ACC	1118,4423	1118,4417	≥ 99%
SMXI21	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-hCha-His(Bzl)-Arg-ACC	1132,4579	1132,4569	≥ 99%
SMXI22	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-2-Aoc-Nle(O-Bzl)-Arg-ACC	1098,4623	1098,4618	≥ 97%
SMXI23	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-2-Aoc-hSer(Bzl)-Arg-ACC	1070,4310	1070,4296	≥ 99%
SMXI24	Ac-Ile-Nle-Asn-Arg-ACC	757,3997	757,3992	≥ 99%

5.5. Badanie aktywności biologicznej czynników krzepnięcia krwi względem zdefiniowanych substratów

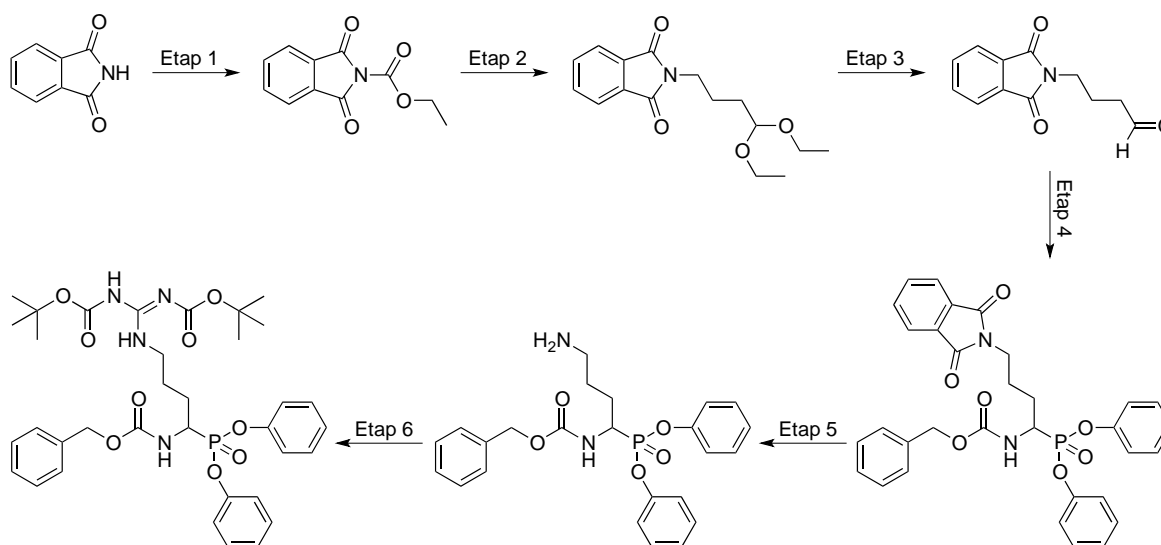
Wszystkie substraty zaprojektowane dla APC, trombiny, czynnika Xa i czynnika XIa badano względem tych enzymów pod kątem ich selektywności w następujący warunkach: substraty o początkowym stężeniu 10 mM rozcieńczano 100-krotnie w DMSO, a 1 µL takiego rozcieńczenia umieszczano w jednym dołku, po czym dodawano 99 µL enzymu preinkubowanego w buforze (15 minut, 37°C). Końcowe stężenie substratu wynosiło 1 µM, a stężenie enzymów dobierano indywidualnie dla każdej grupy substratów w celu uzyskania odpowiedniego sygnału fluorescencji. Końcowe stężenie enzymów mieściło się w zakresie

50-120 nM dla APC, 0,15-35 nM dla trombiny, 7-100 nM dla czynnika Xa i 5 nM dla czynnika XIa, w zależności od użytej grupy substratu. Przyrost fluorescencji monitorowano przez 30 minut ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$), a do analizy wzięto liniową część każdego wykresu, na podstawie której określono szybkość hydrolizy danego substratu (RFU/s). Otrzymane wartości RFU/s przyrównano odpowiednio do wartości odpowiadającej tej samej aktywności enzymu. Każdy pomiar wykonano 3-krotnie, a dane przedstawiono jako wartość średnią z tych powtórzeń.

5.6. Wyznaczenie parametrów kinetycznych (k_{kat} , K_M , k_{kat}/K_M) selektywnych substratów

Parametry kinetyczne (k_{kat} , K_M , k_{kat}/K_M) wybranych substratów znakowanych ACC wyznaczono metodą regresji nieliniowej Michaelisa-Menten zgodnie z protokołem opisanym przez Porębę i współpracowników [79]. Każdy substrat rozcieńczano seryjnie do ósmego dołka, uzyskując stężenia w zakresie od 1,16 nM do 741 μM , w zależności od użytego substratu. Następnie każdy enzym w końcowym stężeniu w zakresie 2,19-425 nM dla APC, 0,07-346 nM dla trombiny, 2,80-224 nM dla czynnika Xa, 5 nM dla czynnika XIa preinkubowano (15 minut, 37 °C) w buforze i dodawano do studzienek zawierających osiem różnych stężeń substratów. Uwalnianie znacznika ACC mierzono przez 30 minut ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Pomiar dla każdego substratu wykonano 3-krotnie, a parametry kinetyczne obliczono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism i Microsoft Excel.

5.7. Synteza grupy wiążącej Cbz-(di-*t*-Boc-Arg)^P(OPh)₂



Rysunek 42. Schemat syntezy grupy wiążącej Cbz-(di-*t*-Boc-Arg)^P(OPh)₂.

5.7.1. Synteza *N*-etoksykarbonyloftalimidu

W kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne umieszczono ftalimid (62,3 g, 0,420 mola) i 200 mL DMF. Po jego rozpuszczeniu dodano trójetyloaminę (68,0 mL, 0,500 mola), mieszaninę schłodzono do 0°C i przepuszczono argon przez 15 minut. Do kolby za pomocą wkraplacza w ciągu dwóch godzin dodano chloromrówczan etylu (51,0 mL, 0,550 mola). Po tym czasie reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 3 godziny, a następnie mieszaninę wylano na rozdrobiony lód z wodą (około 2 kg). Po roztopieniu lodu wytrącony biały osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, przeniesiono na rozdzielacz i ekstrahowano w 250 mL chloroformu. Warstwę organiczną zebrano, a pozostałą warstwę wodną ekstrahowano dodatkową porcją (50 mL) chloroformu. Warstwy organiczne połączono, suszono bezwodnym MgSO₄ i umieszczono w lodówce na 24 godziny. Następnie odsączono nieprzereagowany ftalimid i środek suszący, lotne składniki odparowano do 2/3 objętości i dodano 250 mL eteru naftowego. Powstały osad zawierający głównie ftalimid ponownie odrzucono, a do przesączu dodano 100 mL eteru naftowego. Produkt krystalizowano w temperaturze pokojowej, a powstały biały osad zebrano na drodze filtracji pod zmniejszonym ciśnieniem i suszono na powietrzu do stałej masy otrzymując 66,6 g *N*-etoksykarbonyloftalimidu z wydajnością 72%. Produkt użyto w kolejnym etapie bez wcześniejszego oczyszczania.

HRMS: [M+H]⁺ obliczone = 220,0537, [M+H]⁺ zmierzone = 220,0540

5.7.2. Synteza acetalu dietylowego aldehydu *N*-ftaloilo-4-aminomasłowego

W kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne umieszczono *N*-etoksykarbonyloftalimid (4,02 g, 18,0 mmola) i rozpuszczono go w 20 mL bezwodnego THF. Następnie dodano acetal dietylowy aldehydu 4-aminomasłowego (3,40 mL, 18,0 mmola) i trójetyloaminę (2,70 mL, 19,0 mmola). Reakcję prowadzono przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę odparowano na wyparce rotacyjnej, pozostałość ekstrahowano heksanem, a zebrane ekstrakty organiczne ponownie odparowano. Otrzymany olej ogrzano do temperatury 100°C, aby pozbyć się karbaminianu etylu, produktu ubocznego reakcji. 4,06 g produktu, acetalu dietylowego aldehydu *N*-ftaloilo-4-aminomasłowego otrzymano w postaci jasnożółtego oleju z wydajnością 76%.

HRMS: [M+H]⁺ obliczone = 292,1476, [M+H]⁺ zmierzone = 292,1480

5.7.3. Synteza aldehydu *N*-ftaloilo-4-aminomasłowego

W kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne i wkraplacz umieszczono acetal dietylowy aldehydu *N*-ftaloilo-4-aminomasłowego (2,91 g, 10,0 mmola), 15 mL THF, a następnie w ciągu godziny wkroplono 35 mL 0,5 M roztworu kwasu solnego. Reakcję prowadzono przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie mieszaninę ekstrahowano eterem dietylowym (3 x 70 mL). Frakcje organiczne połączono, wysuszono bezwodnym MgSO₄, przesączono, odparowano na wyparce rotacyjnej i umieszczono w próżni w obecności P₂O₅ na noc w celu dokładnego wysuszenia produktu. W reakcji otrzymano 1,67 g białego osadu aldehydu *N*-ftaloilo-4-aminomasłowego z wydajnością 77%.

HRMS: [M+H]⁺ obliczone = 218,0744, [M+H]⁺ zmierzone = 218,0750

5.7.4. Reakcja α -amidoalkilowania w kwasie octowym

Do kolby okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne dodano fosforyn trifenylu (8,66 mL, 33,0 mmola), karbaminian benzylu (5,00 g, 33,0 mmola), aldehyd *N*-ftaloilo-4-aminomasłowy (8,46 g, 39,0 mmola) oraz 15 mL kwasu octowego. Składniki mieszano przez godzinę, a następnie całość ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 80°C i mieszano przez kolejne 4 godziny. Następnie na wyparce rotacyjnej usunięto lotne składniki mieszaniny, a pozostałość zalano metanolem i umieszczono w temperaturze około -20°C na 72 godziny w celu krystalizacji. Uzyskany produkt przefiltrowano pod zmniejszonym ciśnieniem i wysuszono na powietrzu do stałej masy otrzymując 4,17 g estru difenyłowego kwasu benzyloksykarbonylamino-[(3-*N*-ftalimido)propylo]metanofosfonowego z wydajnością 31%.

HRMS: [M+H]⁺ obliczone = 585,1717, [M+H]⁺ zmierzone = 585,1725

5.7.5. Hydroliza grupy ftaloilowej

Do kolby okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne dodano kwas benzyloksykarbonylamino-[(3-*N*-ftalimido)propylo]metanofosfonowy (3,60 g, 6,00 mmola) i 50 mL alkoholu izopropylowego. Po rozpuszczeniu substratu do kolby dodano wodzian hydrazyny (0,770 mL, 15,0 mmola) i reakcję prowadzono w temperaturze 60°C przez 5 godzin. Hydrolizę grupy ftaloilowej sprawdzono przy pomocy testu ninhydrynowego.

Po zakończeniu reakcji powstały osad hydrazydu odsączono na lejku ze spiekim metodą filtracji pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie przemyto alkoholem izopropylowym. Przesącz odparowano na wyparce rotacyjnej, rozpuszczono w chloroformie i ekstrahowano kilkukrotnie solanką. Fazę organiczną zebrano, wysuszono w obecności MgSO_4 , odparowano i dodano 1 mL 3 M roztworu kwasu solnego/MeOH. Następnie dodawano eter dietylowy aż do momentu zmętnienia i roztwór umieszczono w temperaturze około -20°C na 72 godziny w celu krystalizacji. Powstały osad przefiltrowano pod zmniejszonym ciśnieniem i suszono na powietrzu do stałej masy otrzymując 1,73 g chlorowodoru estru difenylowego kwasu benzyloksykarbonylamino-[(3-amino)propylo]metanofosfonowego z wydajnością 62%.

HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone = 455,1736, $[\text{M}+\text{H}]^+$ zmierzone = 455,1728

5.7.6. Synteza odczynnika guanidynującego

Do kolby okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne dodano tiomocznik (7,62 g, 0,100 mola), bromoetan (8,30 mL, 0,110 mola) oraz absolutny alkohol etylowy i ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 5 godzin. Po tym czasie mieszaninę odparowano na wyparce rotacyjnej, a powstały olej krystalizowano w eterze dietylowym przez noc. Powstały biały osad odsączono na lejku ze spiekim metodą filtracji pod zmniejszonym ciśnieniem, przemyto eterem dietylowym i umieszczono w próżni w obecności P_2O_5 na noc w celu dokładnego wysuszenia. Otrzymany w ten sposób bromowodorek *S*-etyloizotiomocznika (5,00 g, 48,0 mmola) rozpuszczono w 50 mL DCM i dodano DMAP (4,03 g, 33,0 mmola) oraz trójetyloaminę (4,70 mL, 33,0 mmola). Następnie, za pomocą wkraplacza dodano diwęglan di-*tert*-butylu (7,10 g, 33,0 mmola) rozpuszczony w 30 mL DCM, a reakcję prowadzono przez 48 godzin. Po tym czasie lotne składniki mieszaniny odparowano na wyparce rotacyjnej, a otrzymany produkt, *N,N'*-di-Boc-*S*-etyloizotiomocznik, oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie rozpuszczalników chloroform:octan etylu 5:1.

HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone = 305,1535, $[\text{M}+\text{H}]^+$ zmierzone = 305,1542

5.7.7. Reakcja guanidynowania

Do kolby okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne odważono *N,N'*-di-Boc-*S*-etyloizotiomocznik (1,70 g, 5,50 mmola), chlorowodorek estru difenylowego kwasu benzyloksykarbonylamino-[(3-amino)propylo]metanofosfonowego (2,10 g, 4,60 mmola), a składniki rozpuszczono w 40 mL chloroformu. Następnie do mieszaniny dodano trójetyloaminę (1,92 mL, 13,8 mmola) oraz chlorek rtęci (1,49 g, 5,50 mmola). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po tym czasie mieszaninę poreakcyjną przesączono przez Celite® na wąskim lejku (Ø 3 cm) i odparowano na wyparce rotacyjnej. Otrzymany olej rozpuszczono w octanie etylu i 2-krotnie ekstrahowano NaHCO₃, 2,5% kwasem cytrynowym oraz solanką. Zebraną fazę organiczną odparowano, a końcowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej w gradientowym układzie rozpuszczalników heksan:octan etylu 5:1, następnie 3:1, 1:1 i na końcu sam octan etylu. Wszystkie frakcje zawierające oczyszczony produkt połączono i odparowano otrzymując 2,87 g estru difenylowego kwasu benzyloksykarbonylamino-[(3-di-*t*-Boc-guanidyno)propylo]metanofosfonowego (Cbz-(di-*t*-Boc-Arg)^P(OPh)₂) z wydajnością 89%.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1,39 (s, 18H), 1,5-1,9 (m, 6H), 4,2-4,3 (m, 1H), 5,05 (s, 2H), 7,08-7,31 (m, 15H), 8,01-8,03 (d, 1H), 8,32-8,42 (t, 1H), 11,46 (s, 1H)

HRMS: [M+H]⁺ obliczone = 697,3002, [M+H]⁺ zmierzone = 697,3004

5.8. Synteza markerów chemicznych i inhibitorów

Sekwencje peptydowe selektywnych substratów wykorzystano do zaprojektowania kowalencyjnych, nieodwracalnych markerów chemicznych (ABPs) i inhibitorów. W pierwszym etapie syntezy każdego ABP 100 mg żywicy 2-chlorotrytylowej (rozmiar ziaren 100-200 µm, stopień podstawienia 1,60 mmol/g) umieszczono w szklanym reaktorze do syntezy peptydów i spulchniano DCM przez 30 minut, następnie DCM usunięto, a żywicę przemyto dodatkową porcją DCM. Pierwszy z aminokwasów Fmoc-P2-OH (2,5 ekwiwalenta) rozpuszczono w DCM, aktywowano z DIPEA (3 ekwiwalenty, 84,0 µL), dodano do żywicy w atmosferze argonu, a reaktor umieszczono na wytrząsarce kołyskowej na 12 godzin. Po tym czasie żywicę przemyto DCM (3-krotnie), a pozostałe wolne miejsca na żywicy zablokowano poprzez dodanie roztworu DCM/MeOH/DIPEA (% , v/v/v, 80:15:5) na żywicę i mieszanie przez 1 godzinę. Roztwór usunięto, a żywicę przemywano DMF

(6-krotnie), *N*-końcową grupę blokującą Fmoc usunięto przy użyciu 20% piperydyny w DMF (5, 5 i 25 minut) co potwierdzono testem ninhydrynowym. Żywicę przemyto dokładnie DMF (6-krotnie). Po usunięciu grupy Fmoc, aminokwasy P3, P4, Fmoc-6-Ahx-OH/Fmoc-PEG(4)-OH przyłączano do żywicy za pomocą HOBt (2,5 ekwiwalenta, 60,0 mg) i DICl (2,5 ekwiwalenta, 52,0 μ L) jako odczynników sprzęgających w 2,5-godzinnych cyklach. Po każdym sprzęganiu aminokwasów i usuwaniu grupy Fmoc przeprowadzono test ninhydrynowy. Biotynę (2,5 ekwiwalenta, 97,8 mg) sprzęgnięto do żywicy stosując HOBt (2,5 ekwiwalenta, 60,0 mg) i DICl (2,5 ekwiwalenta, 52,0 μ L) w mieszaninie DMF/DMSO (% , *v/v*, 50:50). Po 3 godzinach żywicę przemyto DMF (6-krotnie), DCM (3-krotnie), MeOH (3-krotnie) i umieszczono w próżni w obecności P₂O₅ na noc w celu dokładnego wysuszenia. Peptyd odcięto od żywicy mieszaniną DCM/TFE/AcOH (% , *v/v/v*, 80:10:10), którą dodano na 1 godzinę, następnie zebrany supernatant zatężano i zliofilizowano.

W kolejnym kroku usunięto grupę Cbz z zsyntetyzowanego wcześniej fragmentu reagującego Cbz-(di-*t*-Boc-Arg)^P(OPh)₂ przy użyciu wodoru i palladu na węglu. W kolbie dwuszyjnej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne umieszczono fragment reagujący rozpuszczony w MeOH. Powietrze z układu usunięto strumieniem argonu (około 10 minut) i dodano pallad na węglu. Argon zamieniono na wodór, deprotekcję prowadzono około godzinę, reakcję monitorując na HPLC analitycznym. Po zakończonej reakcji, przez układ przepuszczono argon, a katalizator usunięto za pomocą hydrofilowego filtra. Lotne składniki odparowano na wyparce rotacyjnej. Otrzymany ⁺H₃N-(di-*t*-Boc-Arg)^P(OPh)₂ (1 ekwiwalent) sprzęgano z sekwencją peptydową biotyna-6-Ahx-P4-P3-P2-COOH/biotyna-PEG(4)-P4-P3-P2-COOH (1,2 ekwiwalenta), z HATU (1,2 ekwiwalenta) i 2,4,6-kolidyną (4 ekwiwalenty) w DMF. Reakcję monitorowano za pomocą analitycznego HPLC i po 2 godzinach produkt rozpuszczono w octanie etylu i ekstrahowano 5% NaHCO₃, 5% kwasem cytrynowym i solanką. Fazę organiczną zebrano, wysuszono bezwodnym MgSO₄ i odparowano na wyparce rotacyjnej. Na koniec usunięto grupy blokujące na łańcuchach bocznych aminokwasów za pomocą mieszaniny TFA/DCM/TIPS (% , *v/v/v*, 80:15:5). Po 30 minutach kwas odparowano strumieniem argonu, a otrzymany produkt (biotyna-6-Ahx-P4-P3-P2-Arg^P(OPh)₂/biotyna-PEG(4)-P4-P3-P2-Arg^P(OPh)₂) rozpuszczano w DMSO i oczyszczano na półpreparatywnym HPLC. Czystość markerów chemicznych potwierdzono za pomocą HPLC analitycznego, a masę cząsteczkową poprzez analizę ESI-MS (Tabela 13). Związki następnie zliofilizowano, rozpuszczono w DMSO do końcowego stężenia równego 10 mM i przechowywano w temperaturze -80°C aż do użycia.

Markery chemiczne zawierające znacznik fluorescencyjny zsyntetyzowano analogicznie do ABPs z biotyną. Ilość żywicy 2-chlorotrylowej zmniejszono do 50 mg i do fragmentu peptydowego (z linkerem 6-Ahx/PEG(4)) dodano ester Cy3-NHS (0,3 ekwiwalenta, 15,0 mg), Cy5-NHS (0,3 ekwiwalenta, 16,0 mg), Cy7-NHS (0,3 ekwiwalenta, 18,0 mg) lub BODIPY FL-NHS (0,3 ekwiwalenta, 10,0 mg) rozpuszczone w DMF i aktywowane z DIPEA (1,2 ekwiwalenta, 17,0 μ L), a reaktor umieszczono na wytrząsarce kołyskowej na noc. Następnie żywicę przemyto DMF (6-krotnie), DCM (3-krotnie), MeOH (3-krotnie) i umieszczono w próżni w obecności P₂O₅ na noc w celu dokładnego wysuszenia. Pozostałe etapy były analogiczne jak w przypadku syntezy markerów chemicznych znakowanych biotyną.

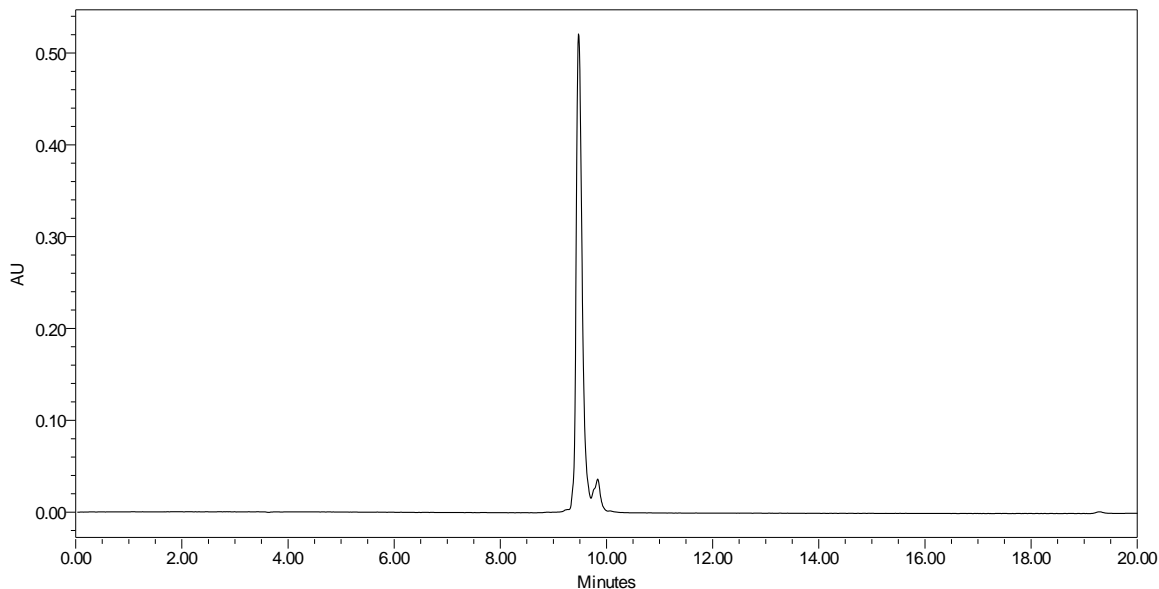
W celu otrzymania inhibitora, grupę aminową fragmentu peptydowego poddano reakcji acetylacji przy użyciu 5 ekwiwalentów AcOH, HBTU i DIPEA w DMF. Po 1 godzinie żywicę przemyto DMF (6-krotnie), DCM (3-krotnie), MeOH (3-krotnie) i wysuszono w obecności P₂O₅. Pozostałe etapy były analogiczne jak w przypadku syntezy markerów chemicznych z biotyną.

Tabela 13. Wyniki analizy ESI-MS i czystości markerów chemicznych i inhibitorów.

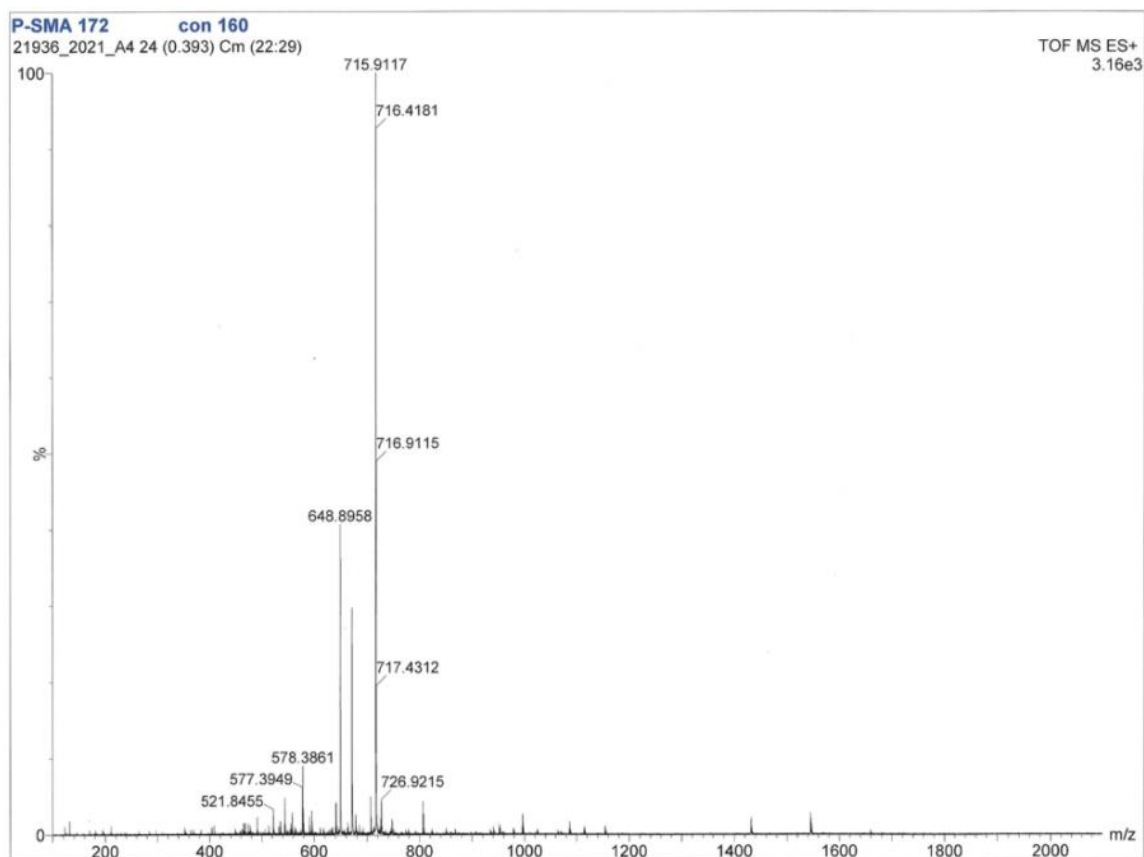
	Struktura	[M+H]⁺²⁺ obliczone	[M+H]⁺²⁺ zmierzone	Czystość
P-SMA61	biotyna-6-Ahx-Lys-Agp-Igl-Arg ^P (OPh) ₂	1131.5691	1131.6002	≥ 95%
P-SMA171	biotyna-6-Ahx-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg ^P (OPh) ₂	1192.6106	1192.6116	≥ 99%
P-SMA261	biotyna-6-Ahx-Lys-βhLys-Igl-Arg ^P (OPh) ₂	1145.6099	1145.6179	≥ 99%
P-SMII221	biotyna-6-Ahx-hCha-Cys(MeBzl)-Pip-Arg ^P (OPh) ₂	1187.5914	1187.5935	≥ 99%
P-SMII321	biotyna-6-Ahx-hLeu-Cys(4-MeOBzl)-Pip-Arg ^P (OPh) ₂	1163.5551	1163.5557	≥ 99%
P-SMX91	biotyna-6-Ahx-DPro-hArg-Bta-Arg ^P (OPh) ₂	1172.5303	1172.5311	≥ 97%
P-SMX151	biotyna-6-Ahx-DPro-hArg-1-Nal-Arg ^P (OPh) ₂	1166.5739	1166.5748	≥ 97%
P-SMX611	biotyna-6-Ahx-Met-hArg-1-Nal-Arg ^P (OPh) ₂	1200.5615	1200.5632	≥ 99%
P-SMXI51	biotyna-PEG(4)-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg ^P (OPh) ₂	1489.5841	1489.5854	≥ 95%
P-SMXI191	biotyna-PEG(4)-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Dht-His(Bzl)-Arg ^P (OPh) ₂	786.8096	786.8090	≥ 97%
P-SMA172	Cy5-6-Ahx-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg ^P (OPh) ₂	715.9118	715.9117	≥ 95%
P-SMII222	Cy7-6-Ahx-hCha-Cys(MeBzl)-Pip-Arg ^P (OPh) ₂	746.4138	746.4142	≥ 99%
P-SMX152	Cy3-6-Ahx-DPro-hArg-1-Nal-Arg ^P (OPh) ₂	689.8856	689.8862	≥ 99%
P-SMXI52	BODIPY-PEG(4)-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg ^P (OPh) ₂	1537.6167	1537.6165	≥ 95%
I-SMA17	Ac-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg ^P (OPh) ₂	895.4595	895.4594	≥ 97%
I-SMII22	Ac-hCha-Cys(MeBzl)-Pip-Arg ^P (OPh) ₂	890.4404	890.4404	≥ 95%
I-SMX15	Ac-DPro-hArg-1-Nal-Arg ^P (OPh) ₂	869.4227	869.4231	≥ 99%
I-SMXI5	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg ^P (OPh) ₂	1058.3751	1058.3749	≥ 97%

5.9. Analiza chromatograficzna czystości oraz HRMS otrzymanych fluorescencyjnych markerów chemicznych i inhibitorów

P-SMA172, Cy5-6-Ahx-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg^P(OPh)₂

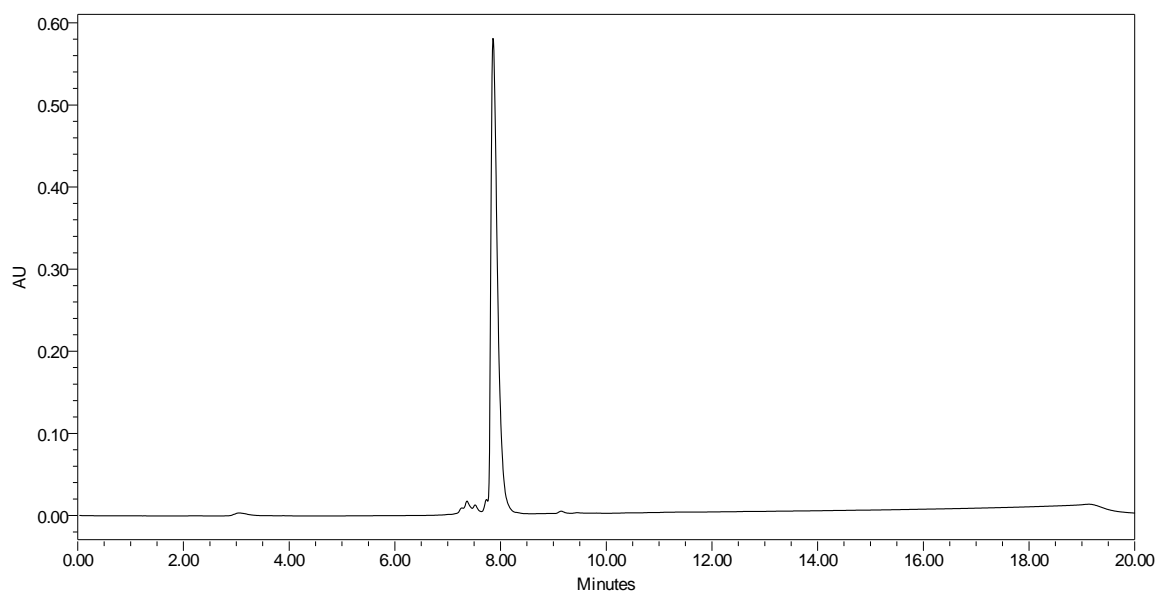


Rysunek 43. Analiza chromatograficzna czystości markera chemicznego P-SMA172.

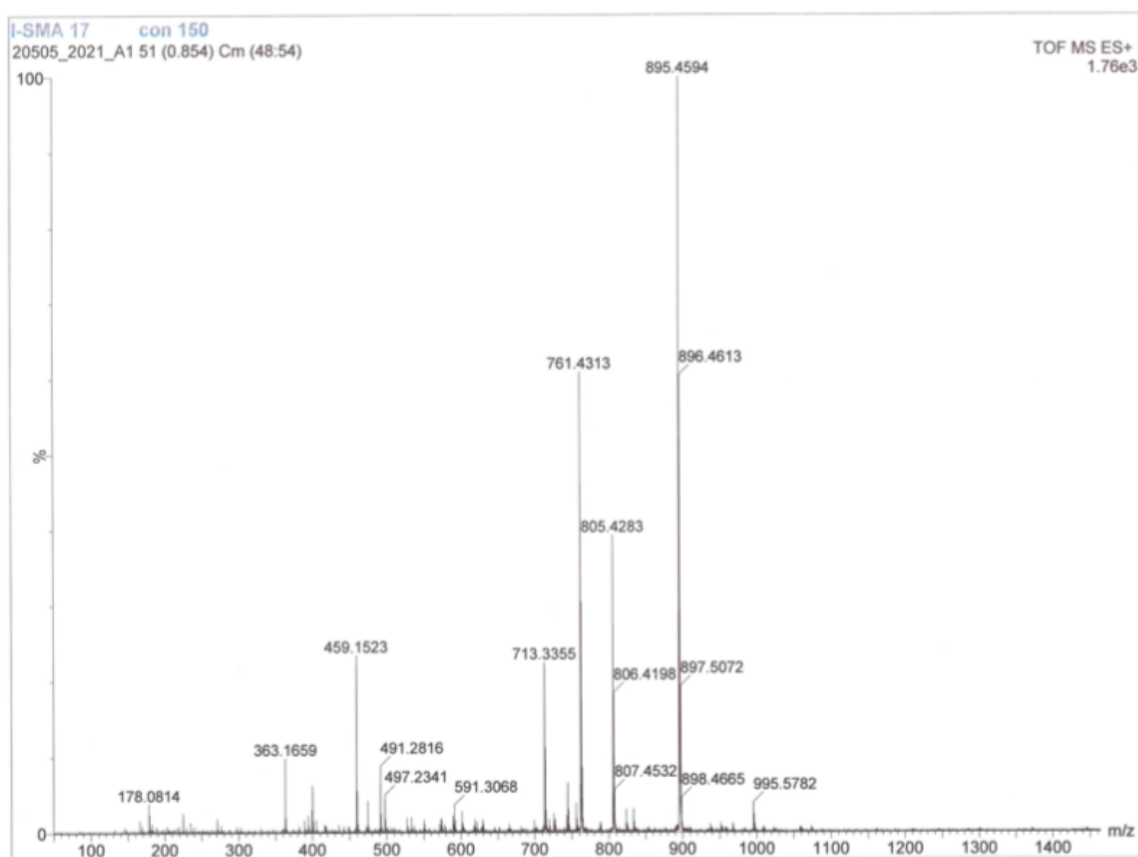


Rysunek 44. Analiza HRMS markera chemicznego P-SMA172.

I-SMA17, Ac-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg^P(OPh)₂

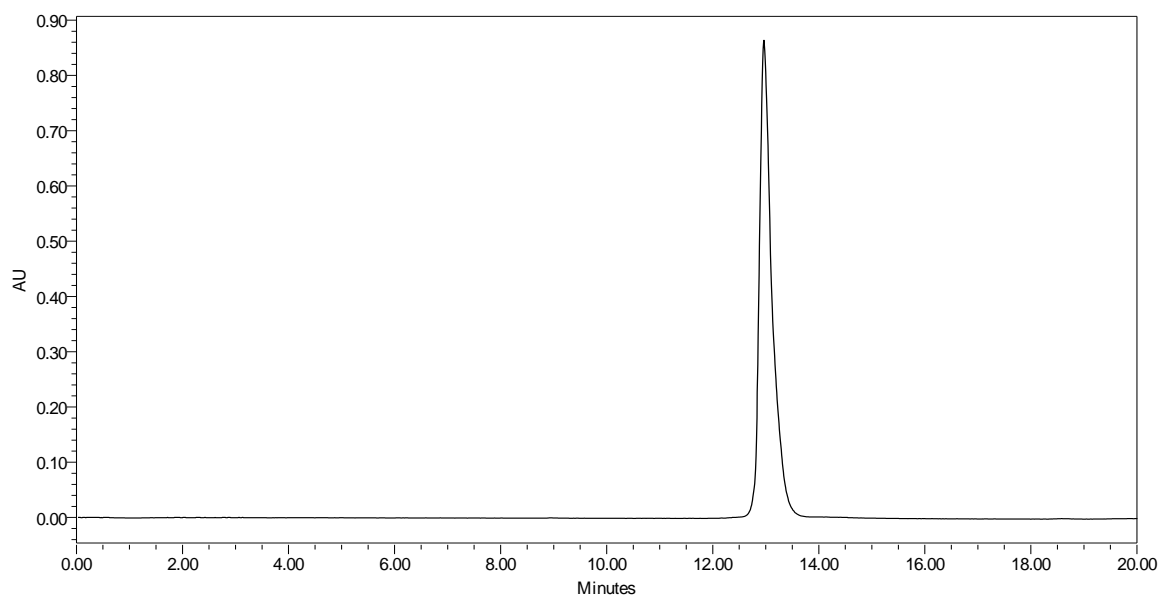


Rysunek 45. Analiza chromatograficzna czystości inhibitora I-SMA17.

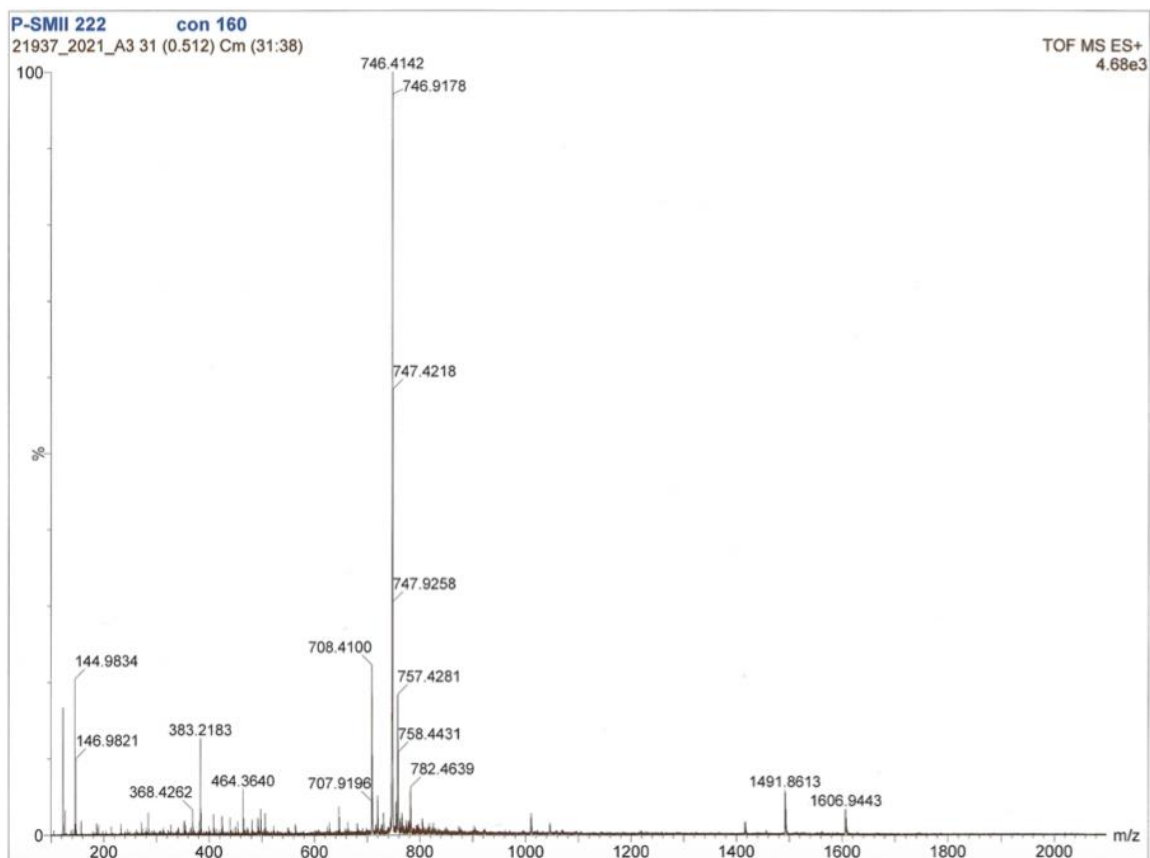


Rysunek 46. Analiza HRMS inhibitora I-SMA17.

P-SMII222, Cy7-6-Ahx-hCha-Cys(MeBzl)-Pip-Arg^P(OPh)₂

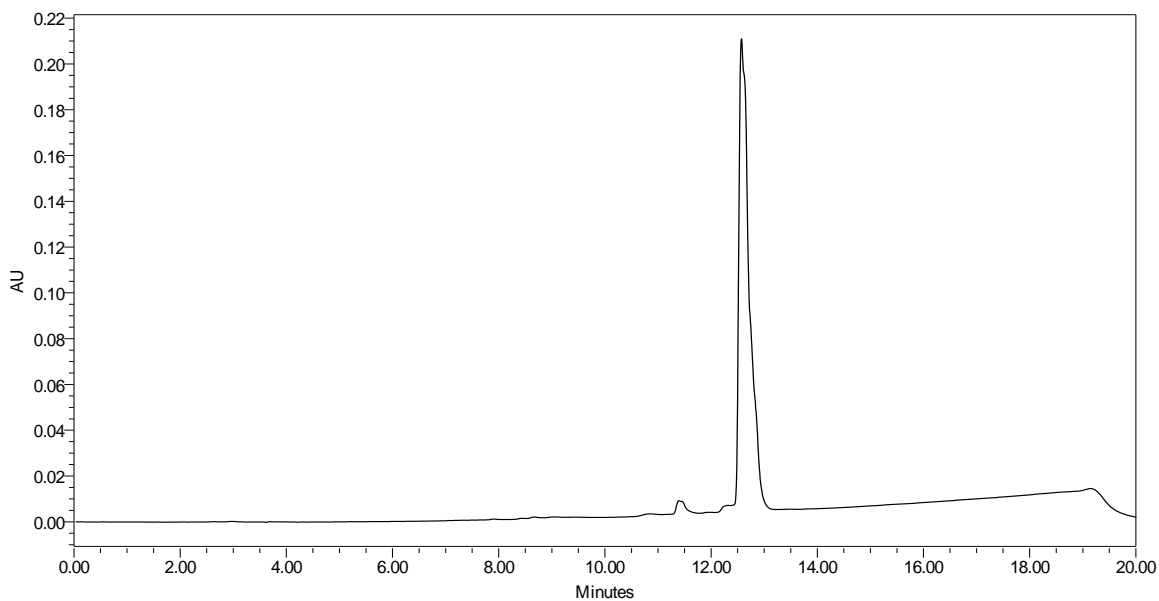


Rysunek 47. Analiza chromatograficzna czystości markera chemicznego P-SMII222.

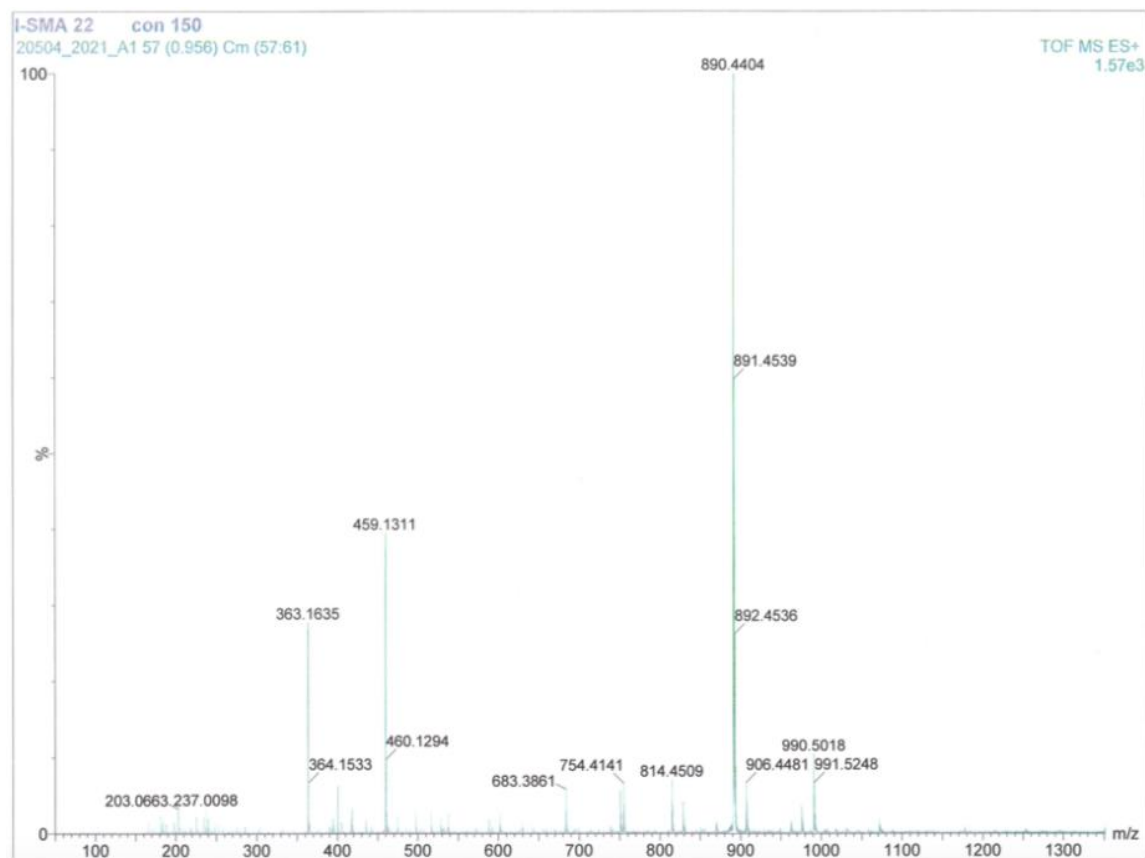


Rysunek 48. Analiza HRMS markera chemicznego P-SMII222.

I-SMII22, Ac-hCha-Cys(MeBzl)-Pip-Arg^P(OPh)₂

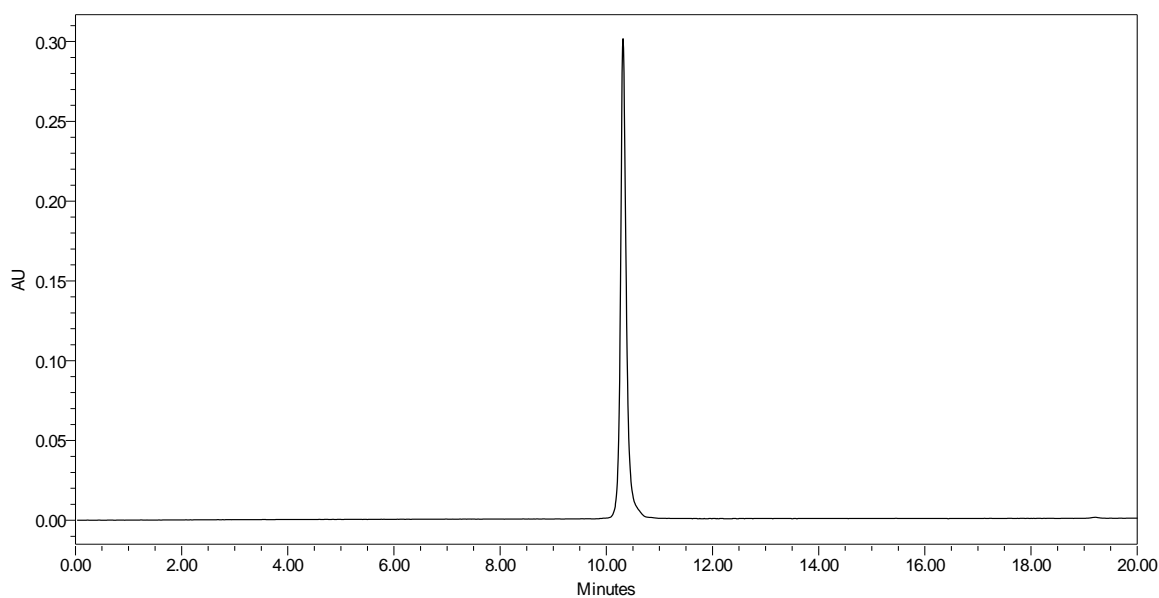


Rysunek 49. Analiza chromatograficzna czystości inhibitora I-SMII22.

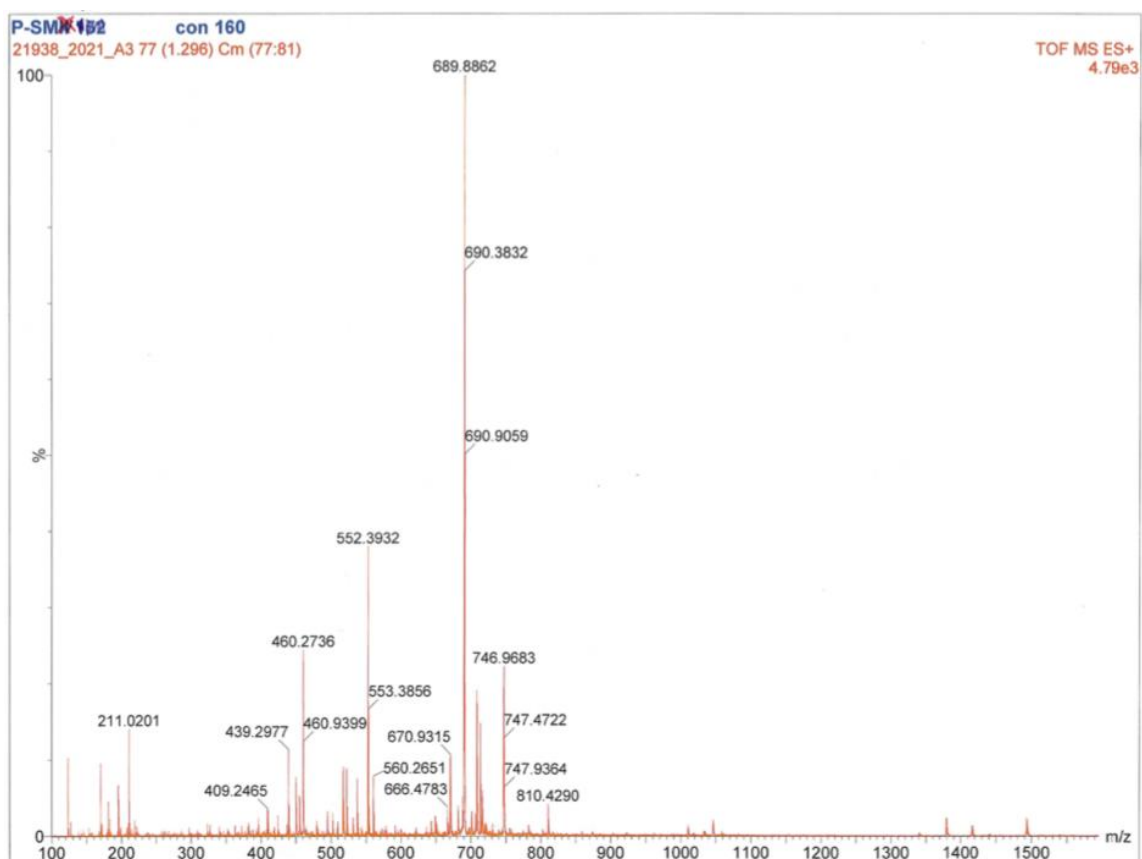


Rysunek 50. Analiza HRMS inhibitora I-SMII22.

P-SMX152, Cy3-6-Ahx-DPro-hArg-1-Nal-Arg^P(OPh)₂

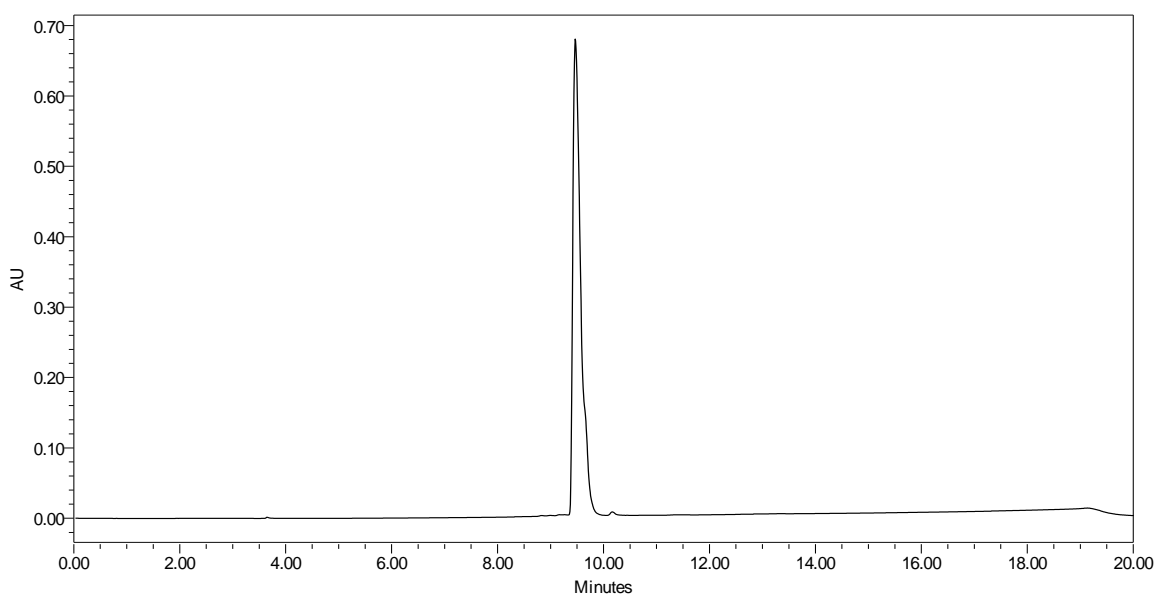


Rysunek 51. Analiza chromatograficzna czystości markera chemicznego P-SMX152.

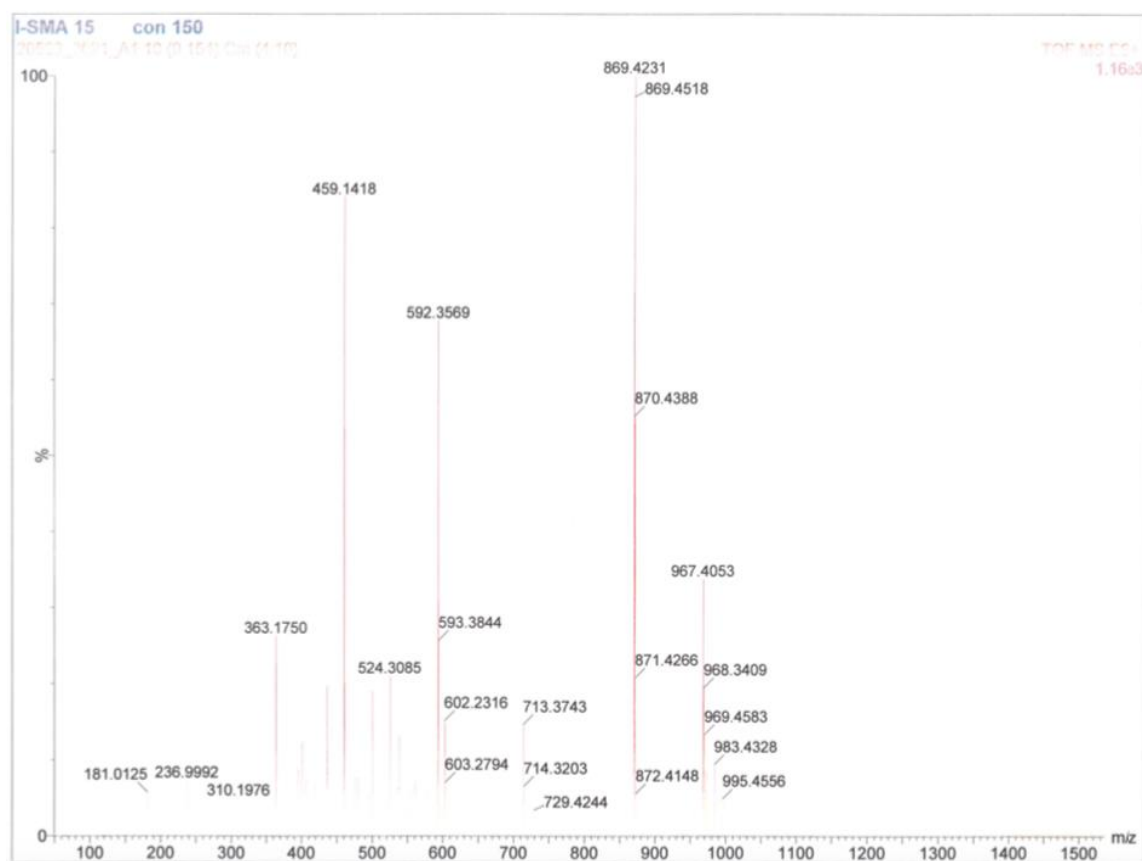


Rysunek 52. Analiza HRMS markera chemicznego P-SMX152.

I-SMX15, Ac-DPro-hArg-1-Nal-Arg^P(OPh)₂

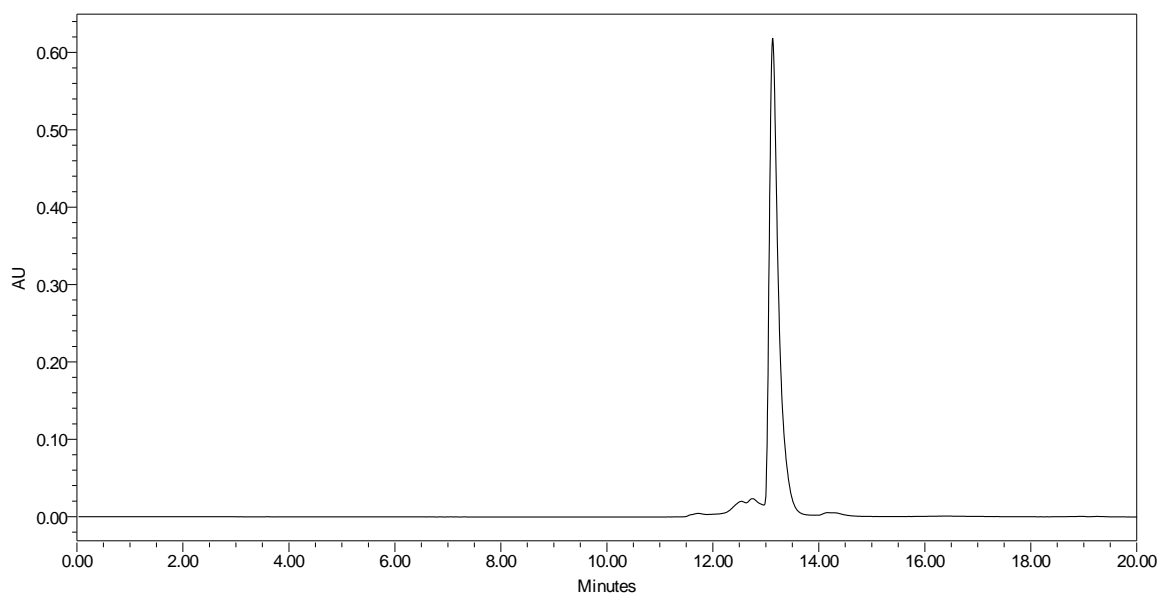


Rysunek 53. Analiza chromatograficzna czystości inhibitora I-SMX15.

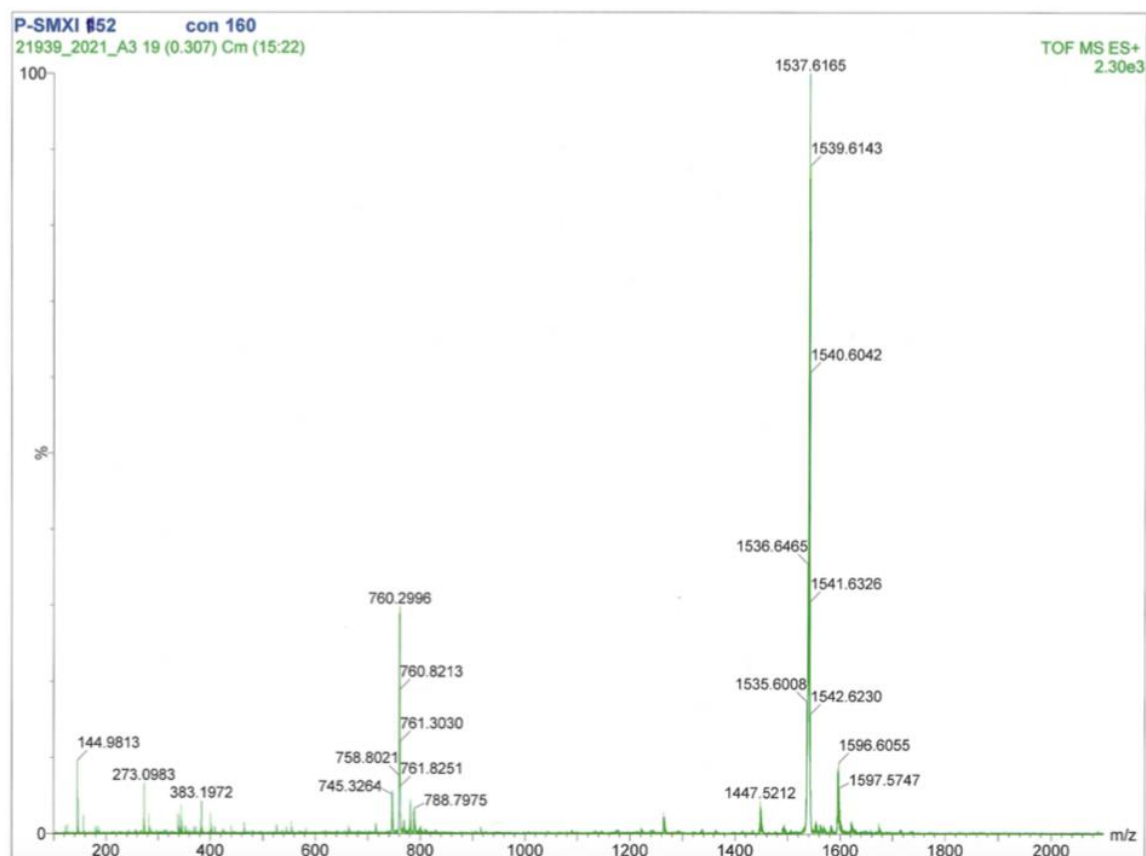


Rysunek 54. Analiza HRMS inhibitora I-SMX15.

P-SMXI52, BODIPY-PEG(4)-Tyr(2,6-Cl₂-Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg^P(OPh)₂

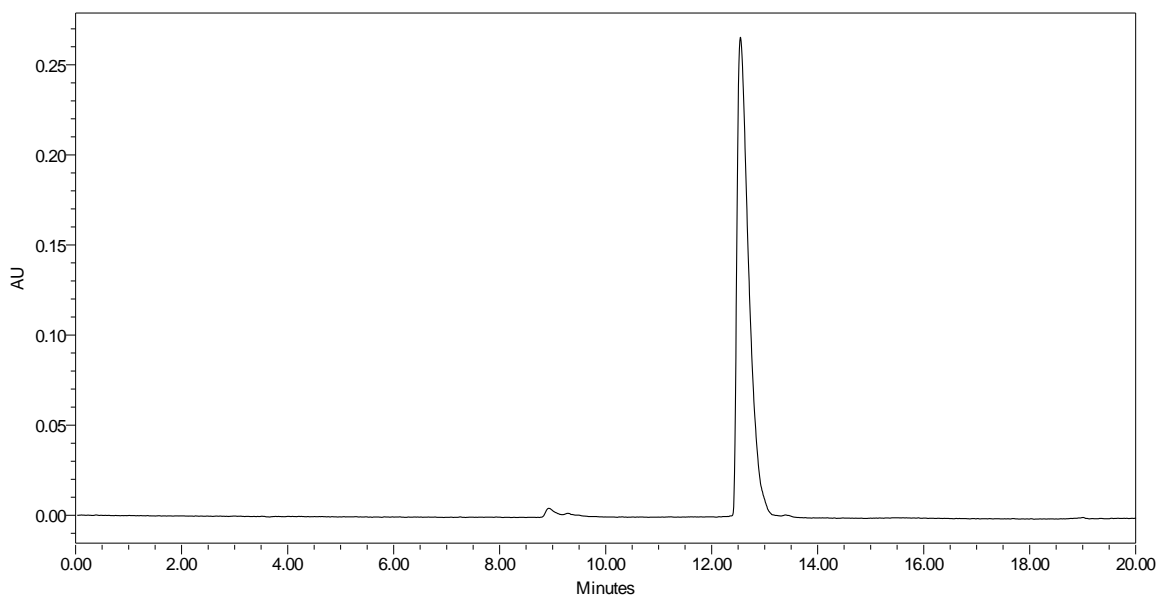


Rysunek 55. Analiza chromatograficzna czystości markera chemicznego P-SMXI52.

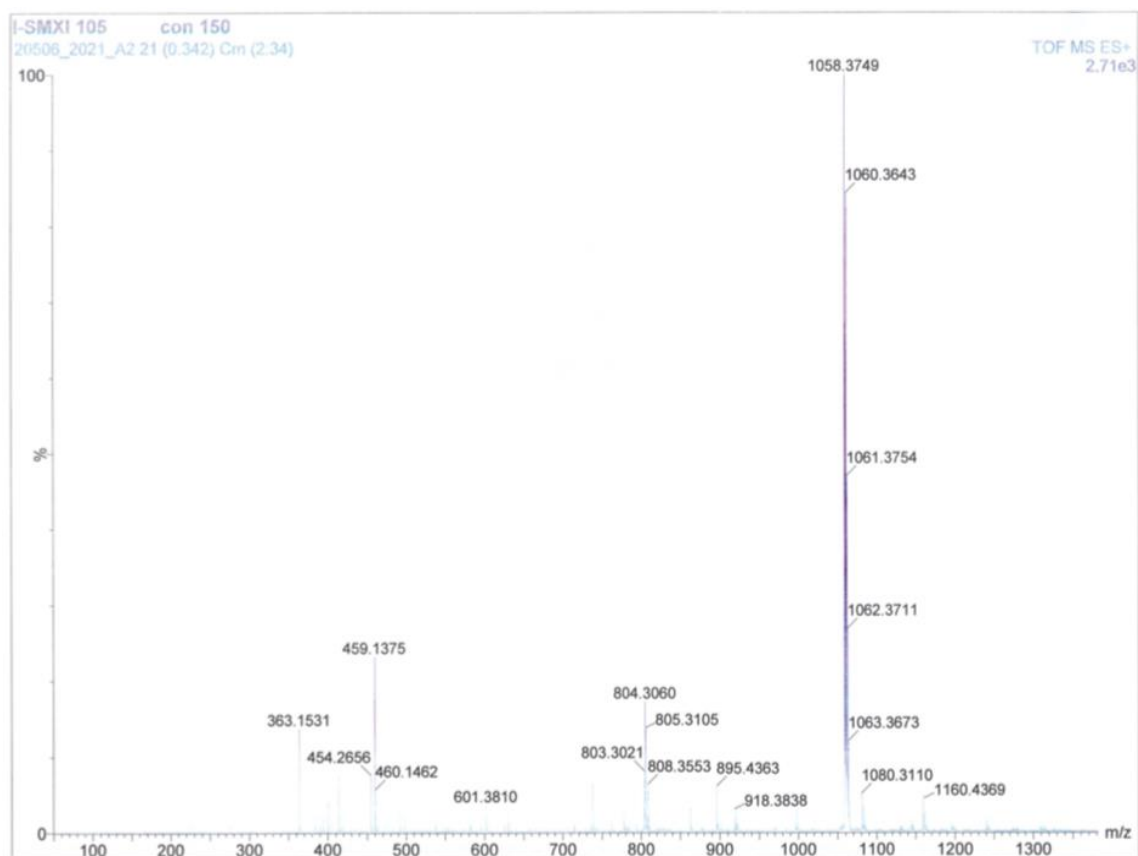


Rysunek 56. Analiza HRMS markera chemicznego P-SMXI52.

I-SMXI5, Ac-Tyr(2,6-Cl₂-Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg^P(OPh)₂



Rysunek 57. Analiza chromatograficzna czystości inhibitora I-SMXI5.



Rysunek 58. Analiza HRMS inhibitora I-SMXI5.

5.10. Badania kinetyczne markerów chemicznych i inhibitorów

W celu wyznaczenia stałych szybkości inhibicji (k_{obs}/I) zsyntetyzowanych markerów chemicznych i inhibitorów wykonano badania kinetyczne, w których związki te były seryjnie rozcieńczane w buforze do siódmego dołka w celu uzyskania stężeń w zakresie od 308 nM do 100 μ M, w zależności od użytego ABP/inhibitora. 20 μ L wybranego substratu (154 μ M SMA5 ($K_M = 86,9 \mu$ M) dla APC, 100 μ M SMA4 ($K_M = 47,9 \mu$ M) dla trombiny, 50 μ M SMIII18 ($K_M = 25,0 \mu$ M) dla czynnika Xa i 100 μ M SMX1 ($K_M = 157,9 \mu$ M) dla czynnika XIa) dodawano do dołków zawierających 20 μ L siedmiu różnych stężeń ABP/inhibitora. Następnie dodawano 60 μ L APC, trombiny, czynnika Xa lub czynnika XIa (w stężeniu 10 nM) preinkubowanych w buforze przez 15 minut w 37°C i mierzono przyrost fluorescencji w czasie ($\lambda_{ex} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$) przez 30 minut. Każdy pomiar wykonano 3-krotnie, wartości k_{obs}/I obliczano przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism i Microsoft Excel [91], a wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej z odchyleniem standardowym.

5.11. Badanie markerów chemicznych i inhibitorów zsyntetyzowanych dla czynników krzepnięcia krwi przy użyciu metody SDS-PAGE

W celu określenia selektywności markerów chemicznych znakowanych biotyną, cztery oczyszczone czynniki krzepnięcia krwi (APC, trombina, czynnik Xa, czynnik XIa) o stałym stężeniu 200 nM inkubowano oddzielnie z każdym markerem (w stosunku marker:enzym 1:1 lub 1:5, w zależności od użytego markera) w buforze (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7,4) przez 30 minut w temperaturze 37°C. Każdy enzym inkubowano z każdym markerem w objętości 40 μ L, a następnie denaturowano za pomocą 20 μ L 3 \times SDS/DTT (30% v/v glicerol, 3% w/v SDS, 0,01% w/v błękit bromofenolowy, 20% v/v ditiotreitrol (dodany bezpośrednio przed użyciem) w wodzie destylowanej) przez 5 minut w temperaturze 95°C. Następnie do pierwszego dołka 15-dołkowego 12% poliakrylamidowego (w/v) żelu nałożono 0,5 μ L wzorca do identyfikacji mas otrzymanych na żelu – wstępnie barwionej mieszaniny białek PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) oraz do kolejnych dołków po 10 μ L każdej próbki. Elektroforezę przeprowadzono przy napięciu 200 V przez 39 minut w buforze Bolt™ MES SDS Running Buffer (Invitrogen™) używając generatora napięcia PowerPac HC High-Current Power Supply (Bio-Rad) oraz modułu Mini Gel Tank (Invitrogen™). Po zakończeniu elektroforezy wykonano transfer białek na membranę nitrocelulozową (0,2 μ m, Bio-Rad) przy napięciu

10 V przez 60 minut w buforze Bolt™ Transfer Buffer (Invitrogen™) z dodatkiem 20% v/v MeOH przy użyciu systemu Mini Blot Module (Invitrogen™). Obecność białek na membranie potwierdzono używając roztworu z dodatkiem barwnika Ponceau S (0,1% w/v Ponceau S, 1% v/v lodowaty kwas octowy w wodzie destylowanej). Membranę następnie przemyto TBS-T (roztwór soli fizjologicznej buforowanej Tris z dodatkiem 0,1 % v/v detergentu Tween-20), a wolne miejsca na membranie blokowano 2,5% (w/v) roztworem surowiczej albuminy wołowej BSA w TBS-T przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Roztwór usunięto i przemyto TBS-T, a membranę inkubowano ze znakowaną fluorescencyjnie streptawidyną (Alexa Fluor 647, rozcieńczenie 1:10 000 w TBS-T z 1% BSA) przez 60 minut. Białka znakowane biotynylowanymi markerami chemicznymi wizualizowano przy użyciu lasera o długości fali 658 nm na urządzeniu Azure Biosystems Sapphire Biomolecular Imager i przy użyciu oprogramowania Azure Spot Analysis Software.

W przypadku fluorescencyjnych markerów chemicznych przygotowanie próbek, elektroforeza i transfer białek na membranę wykonano w taki sam sposób jak opisano wyżej. Znakowane białka wizualizowano bezpośrednio laserami o długości fali 488 nm dla BODIPY, 520 nm dla Cy3, 658 nm dla Cy5 i 784 nm dla Cy7.

Podczas badania wpływu inhibicji na wiązanie się fluorescencyjnego markera chemicznego 200 nM każdego enzymu preinkubowano z odpowiednim inhibitorem (końcowe stężenie inhibitora 5 μM) przez 60 minut. Następnie dodano marker chemiczny (w stosunku marker:enzym 1:1 lub 1:5, w zależności od użytego markera, 30 minut), a elektroforezę, transfer białek na membranę i wizualizację wykonano w taki sam sposób jak w przypadku fluorescencyjnych markerów chemicznych.

5.12. Znakowanie czynników krzepnięcia krwi w ludzkim osoczu

Ludzkie osocze wyizolowano z krwi pełnej (zebranej w probówkach zawierających antykoagulant EDTA) przy użyciu preparatu Polymorphprep™ (Fisher Scientific) i Ficoll Paque Plus (Sigma-Aldrich). Do 15 mL probówki wirówkowej typu Falcon dodano 4 mL Polymorphprep i 1 mL Ficoll Paque Plus. W probówce umieszczono 5 mL krwi pełnej i zwirowano (450 x g, 35 minut, temperatura pokojowa). Uzyskane osocze było następnie ostrożnie oddzielone od osadu komórkowego za pomocą pipety Pasteura i przechowywane w temperaturze -80°C aż do użycia. Przed znakowaniem markerami chemicznymi ludzkie

osocze rozcieńczano 7,5-krotnie w buforze (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7,4).

Podczas optymalizacji warunków detekcji czynników krzepnięcia krwi w ludzkim osoczu, osocze inkubowano z każdym fluorescencyjnym markerem chemicznym w zakresie stężeń markera od 1 do 20 μM. P-SMA172, P-SMII222, P-SMX152 i P-SMXI52 były używane odpowiednio do wizualizowania APC, trombiny, czynnika Xa i czynnika XIa. Osocze inkubowano z każdym markerem w całkowitej objętości 40 μL (20 μL osocza i 20 μL markera o odpowiednim stężeniu) przez 60 minut w temperaturze 37°C. Po zakończonej inkubacji do próbek dodano 20 μL 3 × SDS/DTT i denaturowano przez 5 minut w temperaturze 95°C. Tak przygotowane próbki nakładano w ilości 5 μL na żel, a elektroforezę i transfer białek na membranę przeprowadzono w taki sam sposób jak opisano wyżej. Obecność APC potwierdzono za pomocą pierwszorzędowego przeciwciała poliklonalnego anti-PC (Antibodies-online GmbH, ABIN597333, 1:1000) inkubowanego z membraną przez 7 godzin. Membranę następnie przemyto i dodano drugorzędowe przeciwciało skoniugowane ze znacznikiem fluorescencyjnym Alexa Fluor 488 (Life Technologies, A11039, 2:10000) i inkubowano przez 60 minut (oba przeciwciała w temperaturze pokojowej). Obecność trombiny potwierdzono za pomocą pierwszorzędowego przeciwciała poliklonalnego anti-fII (Haematologic Technologies Inc., PAHFII-S, 1:1000, 7 godzin) i dodanego następnie drugorzędowego przeciwciała skoniugowanego ze znacznikiem fluorescencyjnym Alexa Fluor 680 (Life Technologies, A21102, 2:10000, 60 minut). Obecność czynnika Xa potwierdzono za pomocą pierwszorzędowego przeciwciała poliklonalnego anti-fX (Haematologic Technologies Inc., PAHFX-S, 1:1000, 7 godzin) i dodanego następnie drugorzędowego przeciwciała skoniugowanego ze znacznikiem fluorescencyjnym Alexa Fluor 680 (Life Technologies, A21102, 2:10000, 60 minut). Obecność czynnika XIa potwierdzono za pomocą pierwszorzędowego przeciwciała poliklonalnego anti-fXI (Haematologic Technologies Inc., PAHFXI-S, 1:1000, 7 godzin) i dodanego następnie drugorzędowego przeciwciała skoniugowanego ze znacznikiem fluorescencyjnym Alexa Fluor 680 (Life Technologies, A21102, 2:10000, 60 minut). Następnie membrany analizowano przy użyciu Azure Biosystems Sapphire Biomolecular Imager i Azure Spot Analysis Software w następujący sposób: APC przy 658 nm (Cy5) i 488 nm (przeciwciało), trombina przy 784 nm (Cy7) i 658 nm (przeciwciało), czynnik Xa przy 520 nm (Cy3) i 658 nm (przeciwciało), czynnik XIa przy 488 nm (BODIPY) i 658 nm (przeciwciało).

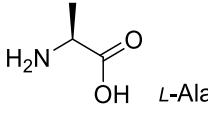
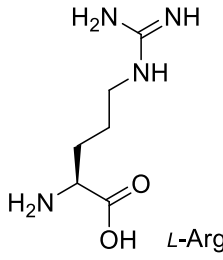
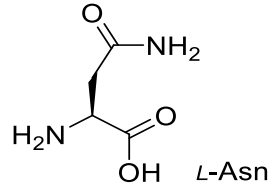
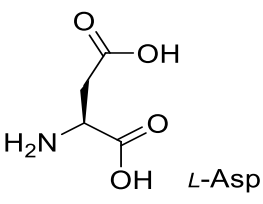
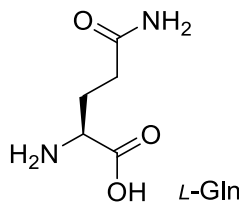
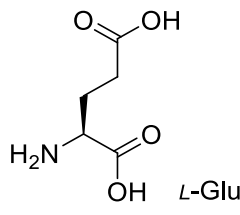
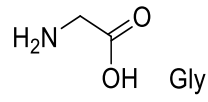
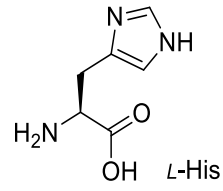
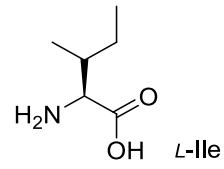
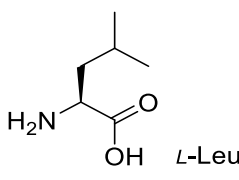
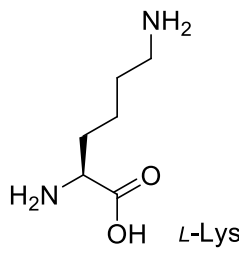
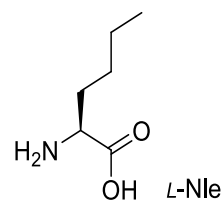
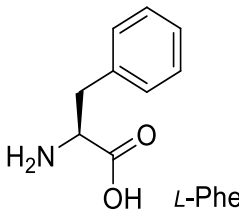
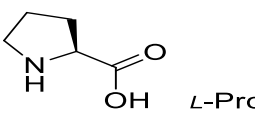
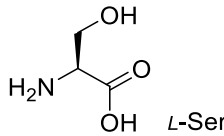
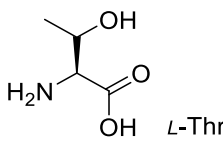
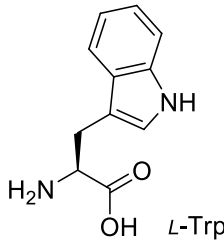
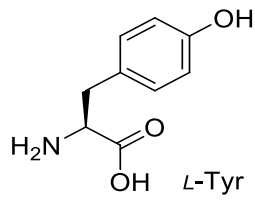
Podczas jednoczesnego znakowania czynników krzepnięcia krwi, ludzkie osocze inkubowano z 5 μ M każdego z trzech fluorescencyjnych markerów chemicznych: P-SMA172, P-SMII222 oraz P-SMX152. Osocze inkubowano z markerami w całkowitej objętości 40 μ L (20 μ L osocza i 20 μ L markera lub ich mieszaniny) przez 60 minut w temperaturze 37°C, a następnie denaturowano za pomocą 20 μ L 3 \times SDS/DTT (5 minut, 95°C). Następnie na 15-dołkowy żel 10% MES (*w/v*) nałożono 2 μ L markera białkowego PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) oraz 5 μ L każdej próbki. Elektroforezę przeprowadzono przy napięciu 100 V przez 140 minut w 10-krotnie rozcieńczonym buforze (1M MES, 1M Tris, 69,3 mM SDS, 20,5 mM EDTA, pH 7,3). Żel był następnie bezpośrednio wizualizowany przy długości fali 520 nm dla Cy3, 658 nm dla Cy5 i 784 nm dla Cy7 przy użyciu Azure Biosystems Sapphire Biomolecular Imager i Azure Spot Analysis Software.

6. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

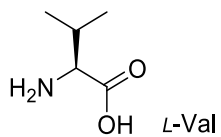
ABP	– marker chemiczny
ACC	– kwas 7-amino-4-kumarynooctowy
ACN	– acetonitryl
AcOH	– kwas octowy
AFC	– 7-amino-4-trifluorometylokumaryna
AMC	– 7-amino-4-metylokumaryna
CaCl ₂	– chlorek wapnia
DCM	– dichlorometan
DICI	– <i>N,N'</i> -diizopropylkarbodiimid
DIPEA	– <i>N,N'</i> -diizopropyletyloamina
DMAP	– 4-dimetyloaminopirydyna
DMF	– <i>N,N'</i> -dimetyloformamid
DMSO	– dimetylosulfotlenek
DTT	– ditiotreitol
EDTA	– sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
ESI-MS	– spektrometria mas z elektrorozpylaniem
Fmoc	– grupa fluorenylometoksykarbonylowa
HATU	– <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy heksafluorofosforan
HBTU	– <i>O</i> -benzotriazol-(<i>N,N,N',N'</i> -tetrametylouroniowy) heksafluorofosforan
HOBt	– <i>N</i> -hydroksybenzotriazol
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa
HRMS	– wysokorozdzielcza spektrometria mas
HyCoSuL	– hybrydowa, kombinatoryczna biblioteka substratów
k_{kat}	– liczba obrotów enzymu w jednostce czasu, wyrażona w s ⁻¹
$k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$	– wydajność katalityczna enzymu względem substratu, wyrażona w M ⁻¹ s ⁻¹
K_{M}	– stała Michaelisa-Menten, wyrażona w M
kolidyna	– 2,4,6-trimetylopirydyna
MeOH	– metanol
MES	– kwas 2-(<i>N</i> -morfolino)etanosulfonowy
MgSO ₄	– siarczan magnezu
NaCl	– chlorek sodu

NMR	– jądrowy rezonans magnetyczny
P ₂ O ₅	– pentatlenek difosforu
PS-SCL	– skanowanie pozycyjne kombinatorycznych bibliotek substratów
RFU/s	– jednostka względnej fluorescencji w czasie
SPPS	– synteza peptydów na podłożu stałym
SDS	– dodecylosiarczan sodu
<i>t</i> -Boc	– grupa <i>tert</i> -butyloksykarbonylowa
TBS-T	– roztwór soli fizjologicznej buforowanej Tris z dodatkiem Tween-20
TFA	– kwas trifluoroctowy
TFE	– 2,2,2-trifluoroetanol
THF	– tetrahydrofuran
TIPS	– triizopropylosilan
TMSCl	– chlorotrimetylosilan
Tris	– tris(hydroksymetylo)aminometan

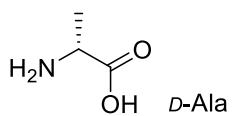
7. STRUKTURY AMINOKWASÓW UŻYTYCH W SYNTEZIE BIBLIOTEK

Lp.	Struktura + oznaczenie	Lp.	Struktura + oznaczenie	Lp.	Struktura + oznaczenie
1	 <chem>C[C@@H](N)C(=O)O</chem> L-Ala	2	 <chem>NC(=N)NCCC[C@@H](N)C(=O)O</chem> L-Arg	3	 <chem>NC(=O)CC[C@@H](N)C(=O)O</chem> L-Asn
4	 <chem>OC(=O)CC[C@@H](N)C(=O)O</chem> L-Asp	5	 <chem>NC(=O)CC[C@@H](N)C(=O)O</chem> L-Gln	6	 <chem>OC(=O)CC[C@@H](N)C(=O)O</chem> L-Glu
7	 <chem>NCC(=O)O</chem> Gly	8	 <chem>C1=CN=C(N1)CC[C@@H](N)C(=O)O</chem> L-His	9	 <chem>CC[C@H](C)C[C@@H](N)C(=O)O</chem> L-Ile
10	 <chem>CC(C)C[C@@H](N)C(=O)O</chem> L-Leu	11	 <chem>NCCCC[C@@H](N)C(=O)O</chem> L-Lys	12	 <chem>CCC[C@@H](N)C(=O)O</chem> L-Nle
13	 <chem>C1=CC=CC=C1CC[C@@H](N)C(=O)O</chem> L-Phe	14	 <chem>C1CCNC1C(=O)O</chem> L-Pro	15	 <chem>OC[C@@H](N)C(=O)O</chem> L-Ser
16	 <chem>CC(O)C[C@@H](N)C(=O)O</chem> L-Thr	17	 <chem>C1=CC=C2C(=C1)C(=CN2)CC[C@@H](N)C(=O)O</chem> L-Trp	18	 <chem>Oc1ccc(cc1)CC[C@@H](N)C(=O)O</chem> L-Tyr

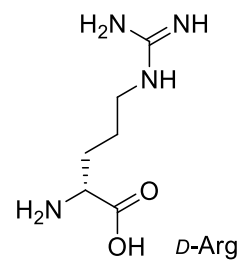
19



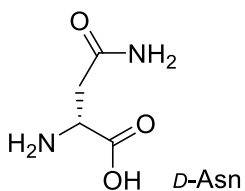
20



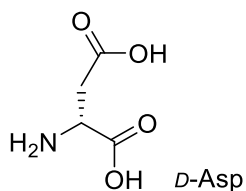
21



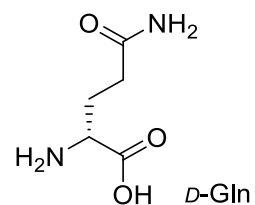
22



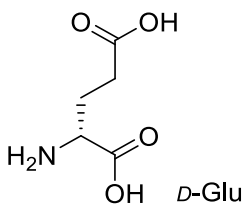
23



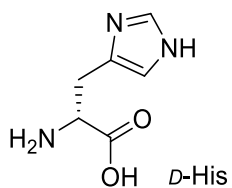
24



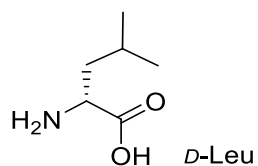
25



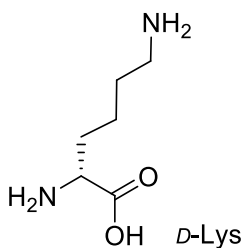
26



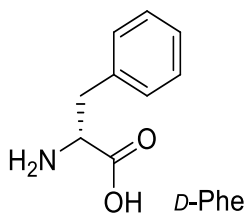
27



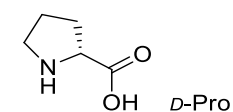
28



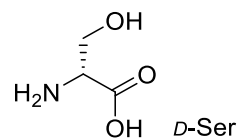
29



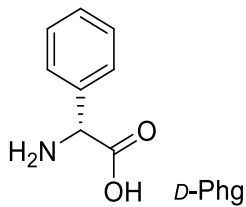
30



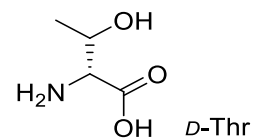
31



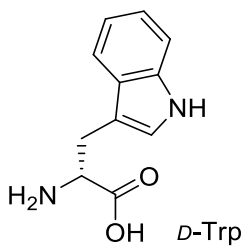
32



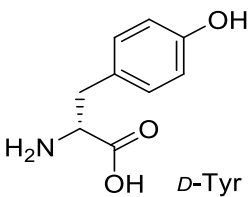
33



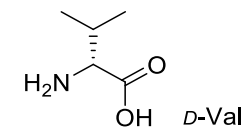
34



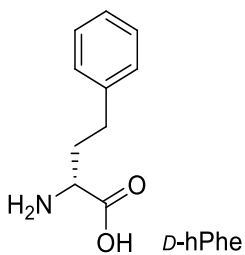
35



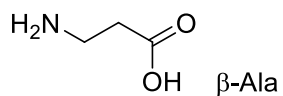
36



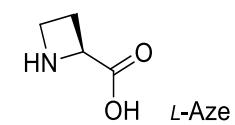
37

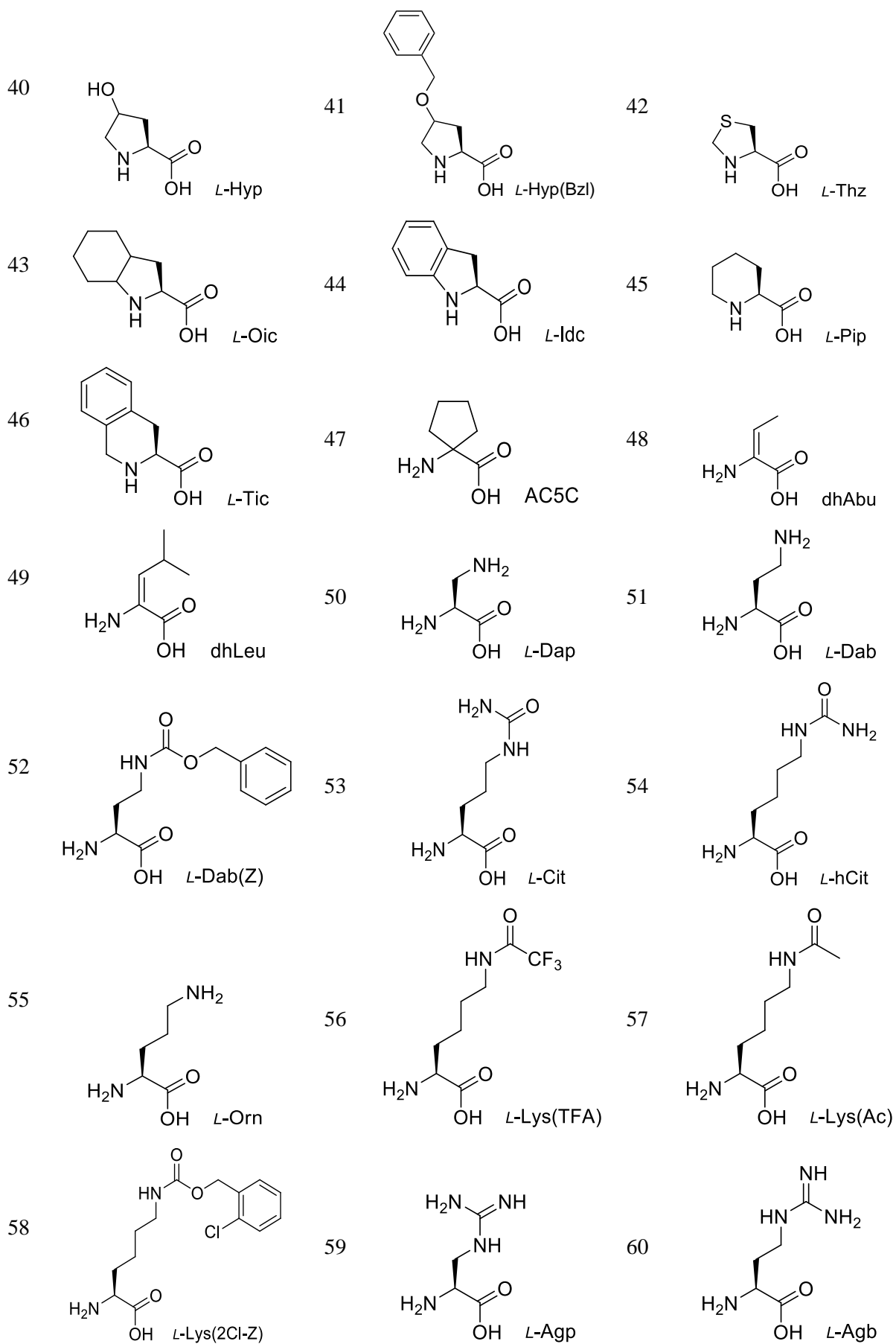


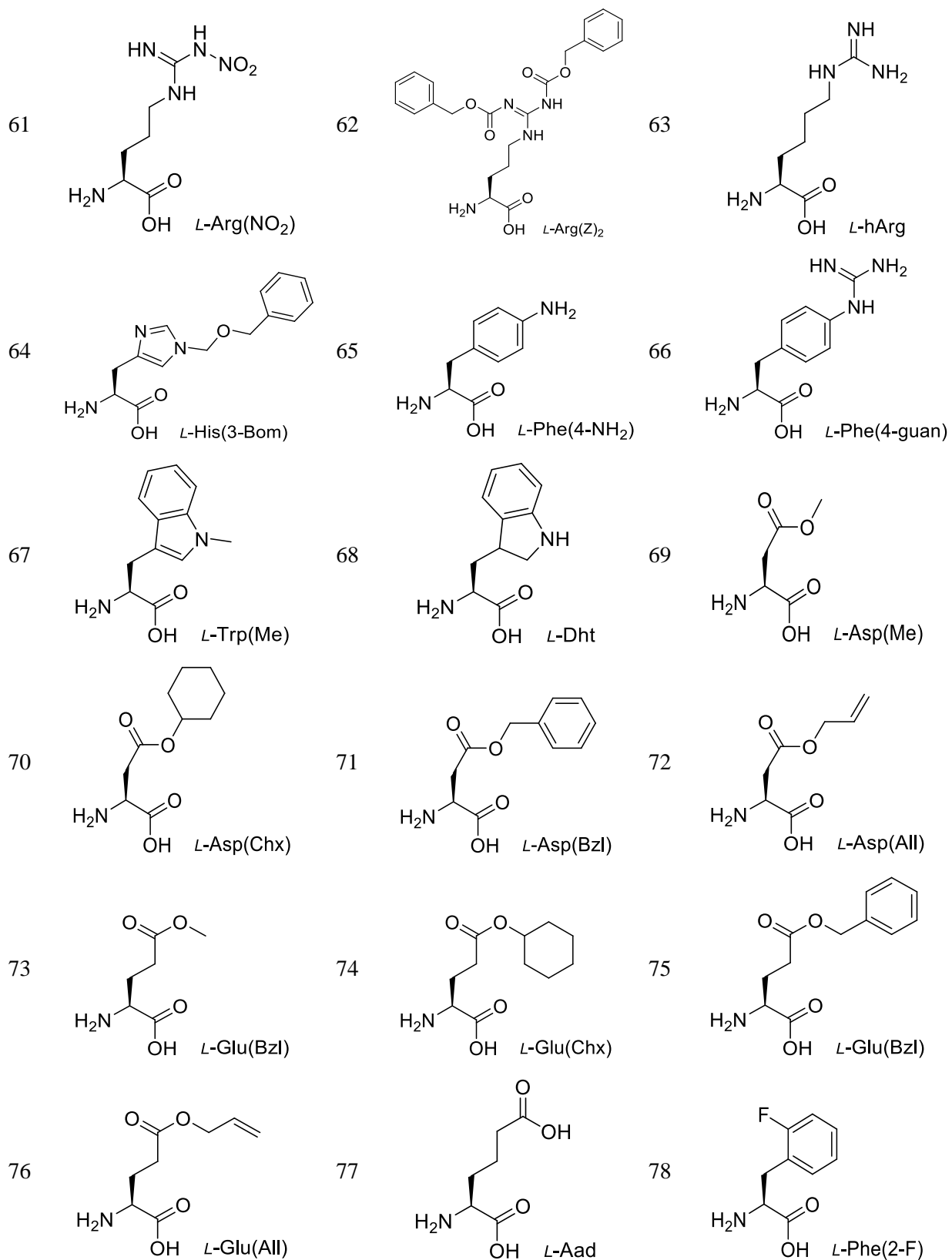
38

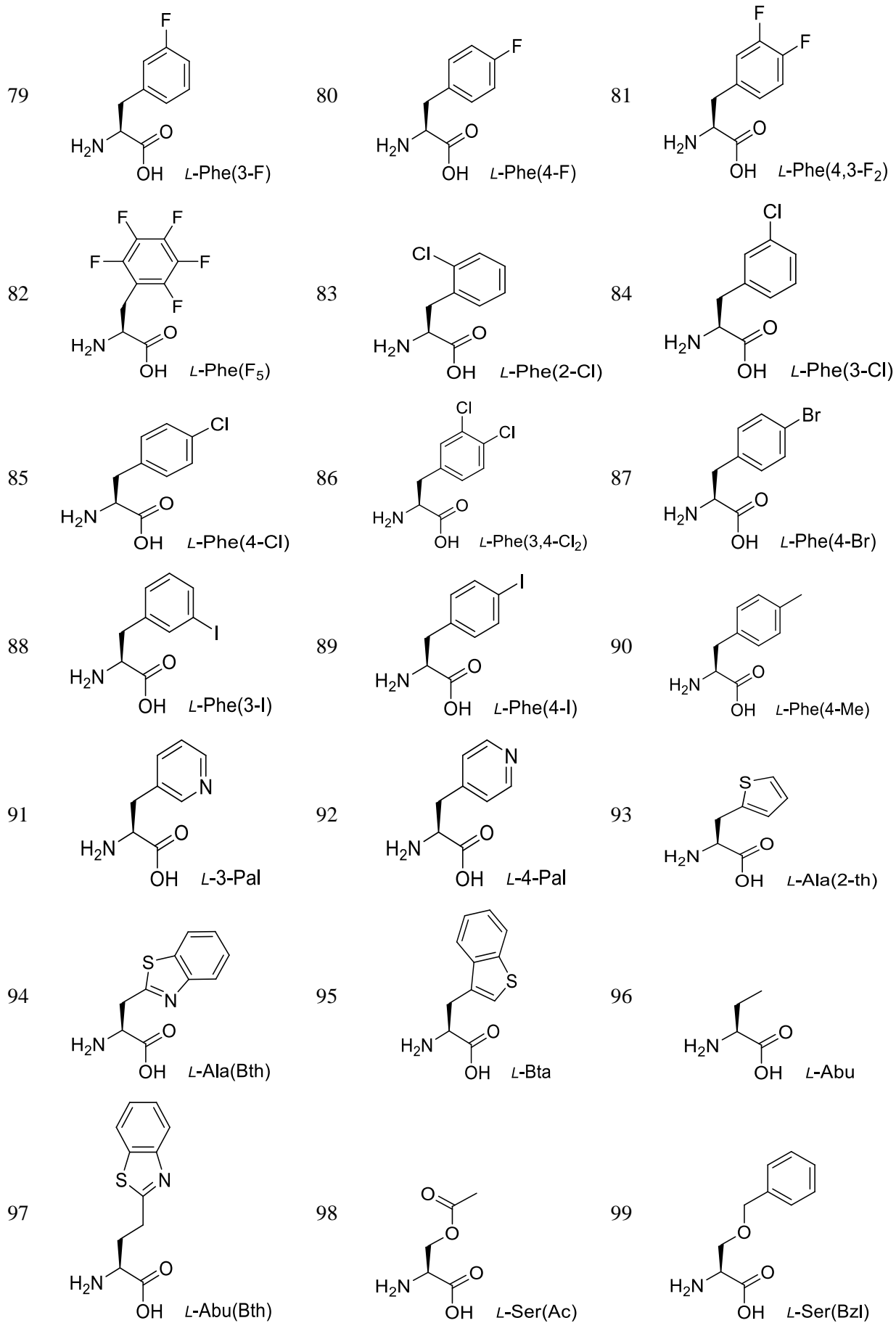


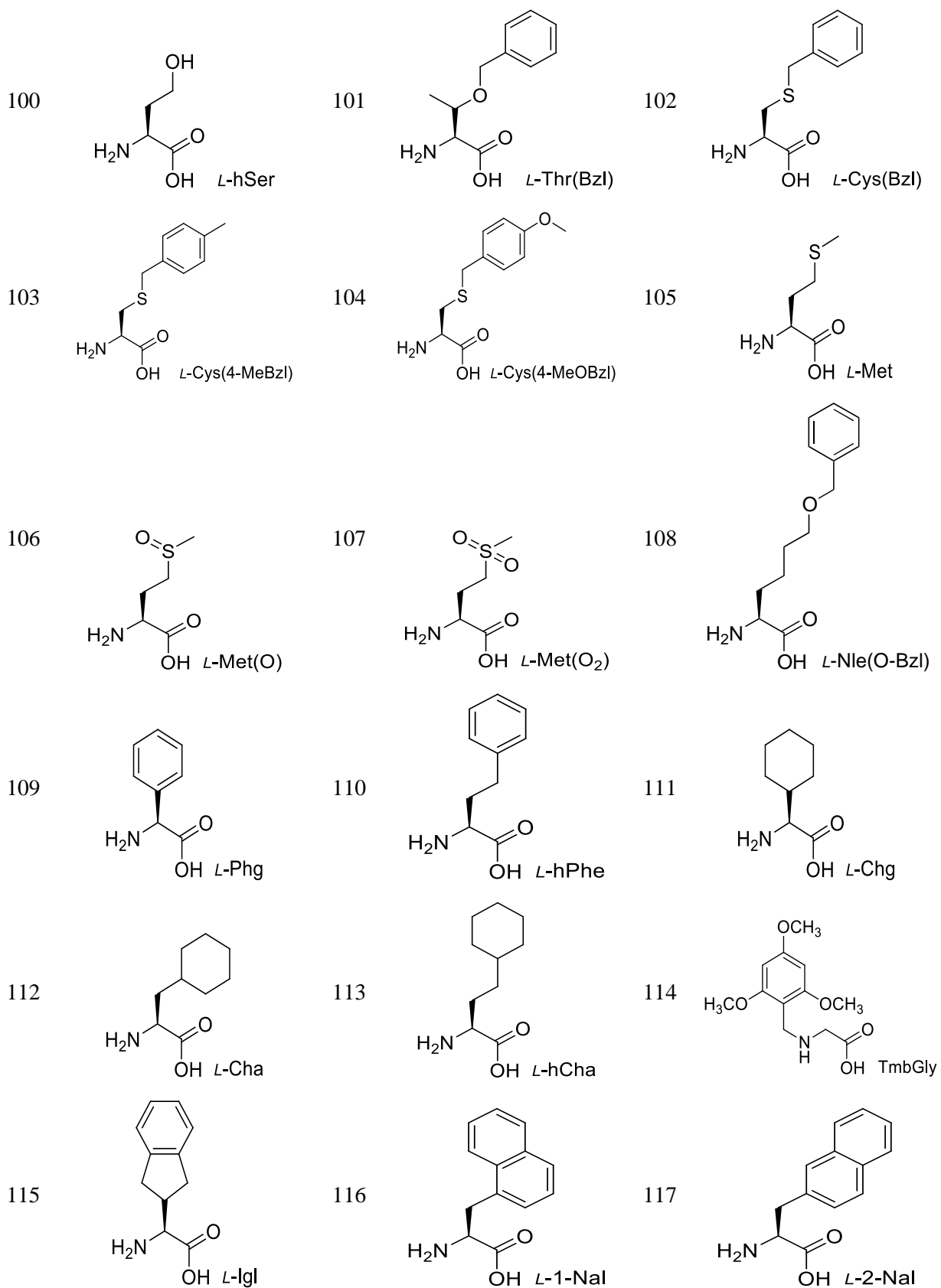
39

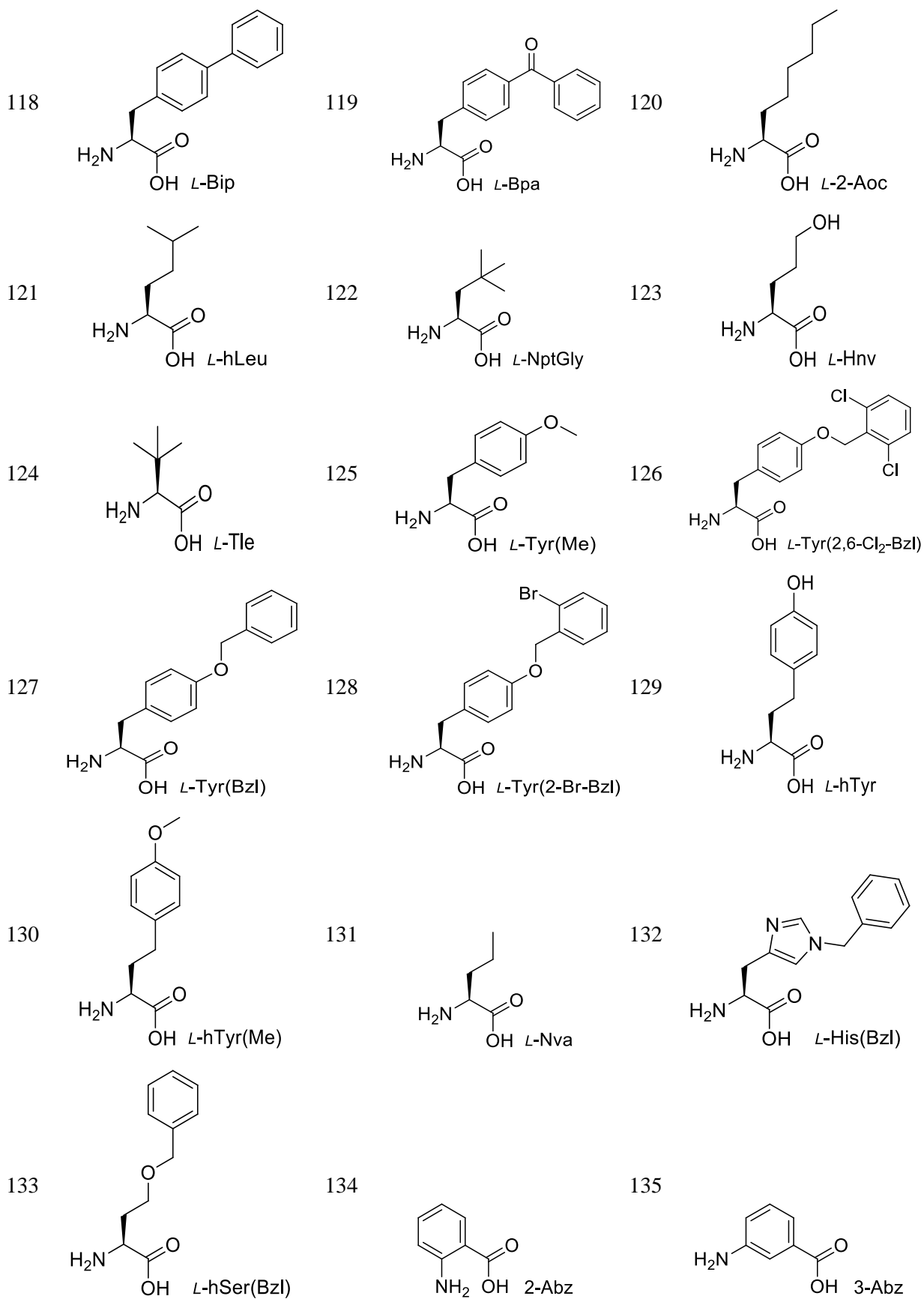


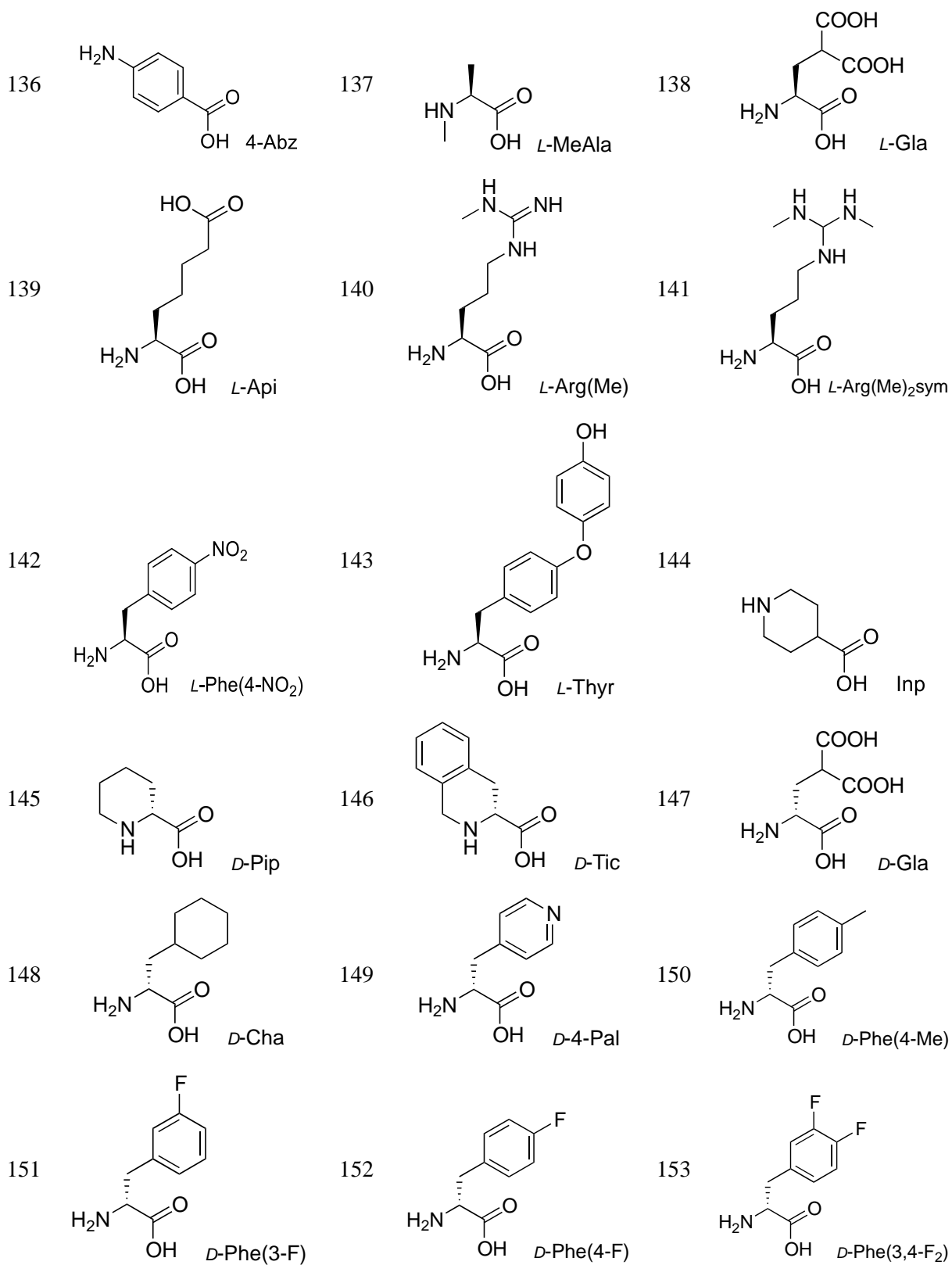


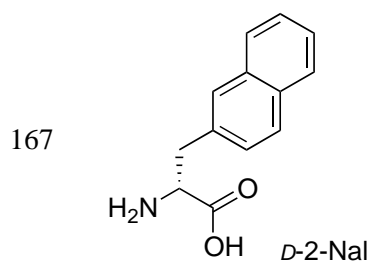
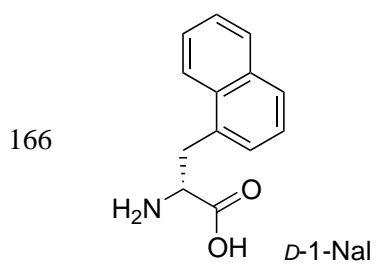
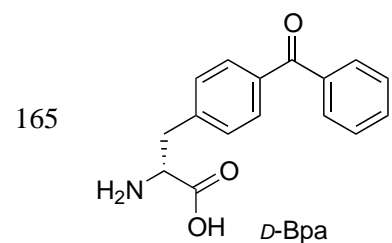
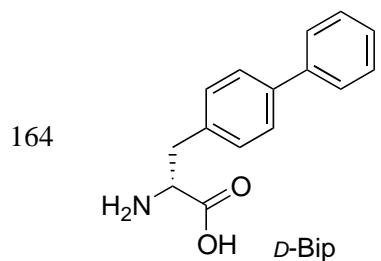
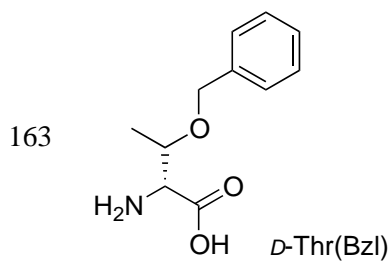
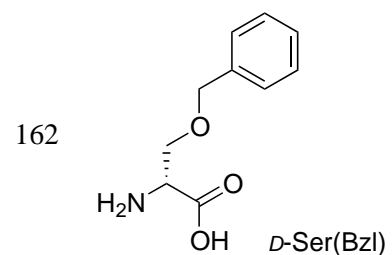
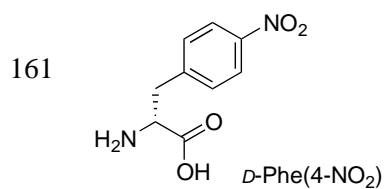
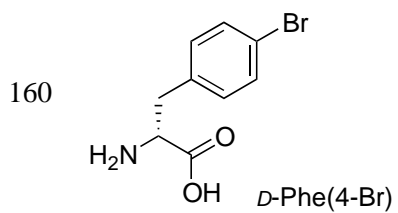
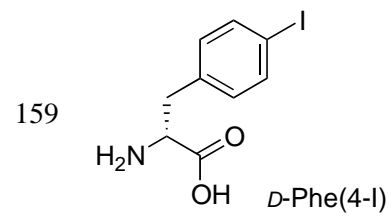
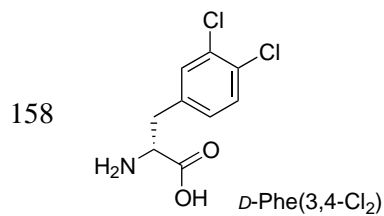
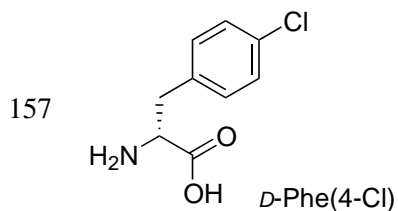
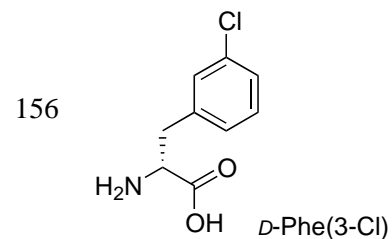
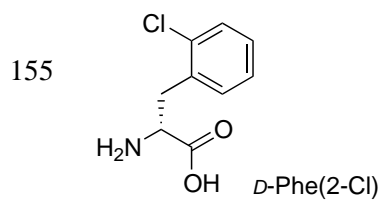
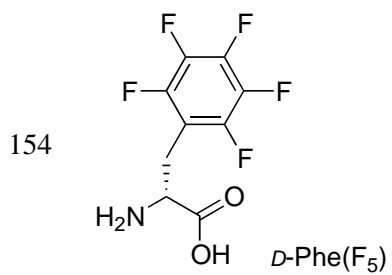












8. DOROBEK NAUKOWY

Publikacje

1. **S. Modrzycka**, S. Kołt, S. Polderdijk, T. Adams, S. Potoczek, J. Huntington, P. Kasperkiewicz, M. Dąg; Parallel imaging of coagulation pathway proteases activated protein C, thrombin, and factor Xa in human plasma; *Chemical Science*, 2022; IF (2021) = 9,825.
2. S. Kołt, T. Janiszewski, D. Kaiserman, **S. Modrzycka**, S.J. Snipas, G.S. Salvesen, M. Dąg, P.I. Bird, P. Kasperkiewicz; Detection of active granzyme A in NK92 cells with fluorescent activity-based probe; *Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 63, 3359-3369; IF (2021) = 7,446.
3. W. Rut, K. Groborz, L. Zhang, **S. Modrzycka**, M. Poręba, R. Hilgenfeld, M. Dąg; Profiling of flaviviral NS2B-NS3 protease specificity provides a structural basis for the development of selective chemical tools that differentiate Dengue from Zika and West Nile viruses; *Antiviral Research*, 2020, 175, 1-9; IF (2021) = 5,970.

Publikacje wysłane do recenzji

1. **S. Modrzycka**, S. Kołt, T. Adams, S. Potoczek, J. Huntington, P. Kasperkiewicz, M. Dąg; Fluorescent activity-based probe to image and inhibit factor XIa activity in human plasma.
2. M. Krzeszewski, **S. Modrzycka**, M. Bousquet, D. Jacquemin, M. Dąg, D. Gryko; Small fluorescent reporters based on a naphthalimide core in activity-based probes for the detection of thrombin.
3. S. Kołt, T. Janiszewski, M. Vizovisek, **S. Modrzycka**, L. Eyssen, B. Turk, M. Dąg, P. Kasperkiewicz; Internally quenched fluorescent substrate to monitor cathepsin K activity.

Wnioski patentowe

1. **S. Modrzycka**, P. Kasperkiewicz, M. Dąg; Compounds for the parallel imaging and inhibition of coagulation pathway proteases – APC, fIIa, fXa, fXIa in human plasma, P.440675 (2022).

Wystąpienia na konferencjach naukowych

1. S. Modrzycka, S. Kołt, S. Polderdijk, T. Adams, P. Kasperkiewicz, J. Huntington, **M. Drąg**; Design of selective activity-based probes for imaging of proteases in coagulation pathway; ASBMB – Serine Proteases in Pericellular Proteolysis and Signaling, 2021, wirtualnie – wystąpienie ustne.
2. **S. Modrzycka**, P. Kasperkiewicz, S. Kołt, S. Polderdijk, T. Adams, J. Huntington, M. Drąg; Chemical tools for the study of activated protein C; XVII Ogólnopolskie Seminarium "Na pograniczu chemii i biologii", 2019, Jastrzębia Góra, Polska – wystąpienie ustne.
3. **S. Modrzycka**, P. Kasperkiewicz, S. Kołt, S. Polderdijk, T. Adams, J. Huntington, M. Drąg; Development of activity-based probe for activated protein C; 36th Winter School on Proteases and Their Inhibitors, 2019, Tiers am Rosengarten, Włochy – wystąpienie ustne.
4. **S. Modrzycka**, W. Rut, K. Groborz, P. Kasperkiewicz, L. Zhang, M. Poręba, R. Hilgenfeld, M. Drąg; Proteases substrate specificity determination as a tool in developing antiviral drugs for the treatment of mosquito-borne disease; XII Copernican International Young Scientists Conference, 2018, Toruń, Polska – wystąpienie ustne.

Nagrody, wyróżnienia i granty

1. Stypendium naukowe Rektora dla najlepszych doktorantów Politechniki Wrocławskiej (2017, 2020).
2. Stypendium doktoranckie z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych (2017, 2020).
3. I miejsce za najlepsze prezentacje ustne na konferencji XVII Ogólnopolskie Seminarium dla Doktorantów i Studentów „Na pograniczu chemii i biologii” (2019).
4. Grant TEAM Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (2017-4/32) – realizacja projektu badawczego „Challenges in the design of selective activity-based probes for proteolytic enzymes” – wykonawca projektu (01.04.2018 – 31.08.2021).

9. LITERATURA

1. Moffitt, K.L., S.L. Martin, and B. Walker, Proteases implicated in apoptosis: old and new. *J Pharm Pharmacol*, 2010. 62(5): p. 563-76.
2. Turk, B., Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. 5(9): p. 785-99.
3. Drag, M. and G.S. Salvesen, Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. 9(9): p. 690-701.
4. Bennett, B. and O.D. Ratnoff, The normal coagulation mechanism. *Med Clin North Am*, 1972. 56(1): p. 95-104.
5. Denault, J.B. and G.S. Salvesen, Apoptotic caspase activation and activity. *Methods Mol Biol*, 2008. 414: p. 191-220.
6. Puente, X.S., et al., A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem Soc Trans*, 2005. 33(Pt 2): p. 331-4.
7. Eatemadi, A., et al., Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017. 86: p. 221-231.
8. Dantuma, N.P. and L.C. Bott, The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2014. 7.
9. Singh, R.B., et al., Role of proteases in the pathophysiology of cardiac disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2004. 263(1): p. 241-256.
10. Lutgens, S.P.M., et al., Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *Faseb Journal*, 2007. 21(12): p. 3029-3041.
11. Burchak, O. N., et al., Fluorescein-based amino acids for solid phase synthesis of fluorogenic protease substrates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2006. 14(8): p. 2559-2568.
12. Schneider, E. L. and C.S. Craik, Positional Scanning Synthetic Combinatorial Libraries for Substrate Profiling. *Methods in Molecular Biology, Proteases and Cancer*, 2009. 539: p. 59-78.
13. McStay, G.P., G.S. Salvesen, and D.R. Green, Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death and Differentiation*, 2008. 15(2): p. 322-331.
14. Berger, A.B., K.B. Sexton, and M. Bogyo, Commonly used caspase inhibitors designed based on substrate specificity profiles lack selectivity. *Cell Research*, 2006. 16(12): p. 961-963.
15. Ferland, G., The vitamin K-dependent proteins: an update. *Nutr Rev*, 1998. 56(8): p. 223-30.
16. Suttie, J.W., Synthesis of vitamin K-dependent proteins. *FASEB J*, 1993. 7(5): p. 445-52.
17. Thornberry, N.A., et al., A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*, 1997. 272(29): p. 17907-11.

18. Drag, M. and G.S. Salvesen, DeSUMOylating enzymes--SENPs. *IUBMB Life*, 2008. 60(11): p. 734-42.
19. Drag, M., et al., Positional-scanning fluorogenic substrate libraries reveal unexpected specificity determinants of DUBs (deubiquitinating enzymes). *Biochem J*, 2008. 415(3): p. 367-75.
20. Choe, Y., et al., Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. *J Biol Chem*, 2006. 281(18): p. 12824-32.
21. Schechter, I., and A. Berger, On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1967. 27(2): p. 157-62.
22. Barrett, A.J. and J.K. McDonald, Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem J*, 1986. 237(3): p. 935.
23. Hartley, B.S., Proteolytic enzymes. *Annu Rev Biochem*, 1960. 29: p. 45-72.
24. Seemuller, E., et al., Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science*, 1995. 268(5210): p. 579-82.
25. Seemuller, E., et al., The proteasome from *Thermoplasma acidophilum* is neither a cysteine nor a serine protease. *FEBS Lett*, 1995. 359(2-3): p. 173-8.
26. Fujinaga, M., et al., The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(10): p. 3364-9.
27. Rawlings, N.D., A.J. Barrett, and A. Bateman, Asparagine peptide lyases: a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. *J Biol Chem*, 2011. 286(44): p. 38321-8.
28. Tajima, N., et al., A novel intein-like autoproteolytic mechanism in autotransporter proteins. *J Mol Biol*, 2010. 402(4): p. 645-56.
29. Liz, M.A., and M.M. Sousa, Deciphering cryptic proteases. *Cell Mol Life Sci*, 2005. 62(9): p. 989-1002.
30. Page, M.J. and E. Di Cera, Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci*, 2008. 65(7-8): p. 1220-36.
31. Page, M.J. and E. Di Cera, Evolution of peptidase diversity. *J Biol Chem*, 2008. 283: p. 30010- 30014.
32. Yousef, G. M., et al., Genomic overview of serine proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003. 305(1): p. 28-36.
33. Heutinck, K.M., et al., Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Mol Immunol*, 2010. 47(11-12): p. 1943-55.
34. Powers, J. C., et al., Mammalian Chymotrypsin-like Enzymes. Comparative Reactivities of Rat Mast Cell Proteases, Human and Dog Skin Chymases, and Human Cathepsin G with Peptide 4-Nitroanilide Substrates and with Peptide Chloromethyl Ketone and Sulfonyl Fluoride Inhibitors. *Biochemistry*, 1985. 24: p. 2048-2058.
35. Appel, W., Chymotrypsin: molecular and catalytic properties. *Clin Biochem*, 1986. 19(6): p. 317-22.
36. Bell, J.K., et al., The oligomeric structure of human granzyme A is a determinant of its extended substrate specificity. *Nat Struct Biol*, 2003. 10(7): p. 527-34.

37. Evin, L. B., J.R. Vasquez, and C.S. Craik, Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection (catalysis/mutagenesis/enzyme kinetics/proteases). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990. 87: p. 6659-6663.
38. Krishnaswamy, S., The transition of prothrombin to thrombin. *J Thromb Haemost*, 2013. 11 Suppl 1: p. 265-76.
39. Griffin, J.H., et al., The promise of protein C. *Blood Cells Mol Dis*, 2006. 36(2): p. 211-6.
40. Weinrauch, Y., et al., Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature*, 2002. 417(6884): p. 91-4.
41. Kam, C.-M., et al., Substrate and inhibitor studies on proteinase 3. *Federation of European Biochemical Societies*, 1992. 297: p.119-123.
42. Spronk, H.M., J.W. Govers-Riemslog, and H. ten Cate, The blood coagulation system as a molecular machine. *Bioessays*, 2003. 25(12): p. 1220-8.
43. Sotiropoulou, G. and G. Pampalakis, Kallikrein-related peptidases: bridges between immune functions and extracellular matrix degradation. *Biol Chem*, 2010. 391(4): p. 321-31.
44. Whitcomb, D. C. and M.E. Lowe, Human pancreatic digestive enzymes. *Digestive diseases and sciences. Dig Dis Sci*, 2007. 52: p. 1-17.
45. Chavez-Galan, L., et al., Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*, 2009. 6(1): p. 15-25.
46. Jordan, K.R., et al., Thrombin generation and activity in multiple sclerosis. *Metab Brain Dis*, 2021. 36(3): p. 407-420.
47. Akiyama, H., et al., Thrombin accumulation in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 1992. 146(2): p. 152-4.
48. Iannucci, J., W. Renehan, and P. Grammas, Thrombin, a Mediator of Coagulation, Inflammation, and Neurotoxicity at the Neurovascular Interface: Implications for Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*, 2020. 14: p. 762.
49. Silverman, G.A., et al., The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem*, 2001. 276(36): p. 33293-6.
50. Huntington, J.A., R. J. Read, and R. W. Carrell, Structure of a serpin protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, 2000. 407: p. 923-926.
51. Ganesan, R., C. Eigenbrot, and D. Kirchhofer, Structural and mechanistic insight into how antibodies inhibit serine proteases. *Biochem J*, 2010. 430(2): p. 179-89.
52. Balasubramanian, A., et al., High-throughput screening for the identification of small-molecule inhibitors of the flaviviral protease. *Antiviral Res*, 2016. 134: p. 6-16.
53. Manzano, M., J. Padia, and R. Padmanabhan, Small molecule inhibitor discovery for dengue virus protease using high-throughput screening. *Methods Mol Biol*, 2014. 1138: p. 331-44.
54. Flexner, C., G. Bate, and P. Kirkpatrick, Tipranavir. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. 4(12): p. 955-6.
55. Kakar, P., T. Watson, and G.Y. Lip, Drug evaluation: rivaroxaban, an oral, direct inhibitor of activated factor X. *Curr Opin Investig Drugs*, 2007. 8(3): p. 256-65.

56. Jensen, C., P. Herold, and H.R. Brunner, Aliskiren: the first renin inhibitor for clinical treatment. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. 7(5): p. 399-410.
57. Kolt, S., et al., Detection of Active Granzyme A in NK92 Cells with Fluorescent Activity-Based Probe. *J Med Chem*, 2020. 63(6): p. 3359-3369.
58. Kasperkiewicz, P., et al., Design of a Selective Substrate and Activity Based Probe for Human Neutrophil Serine Protease 4. *PLoS One*, 2015. 10(7): p. e0132818.
59. Rut, W., et al., Fluorescent activity-based probe for the selective detection of Factor VII activating protease (FSAP) in human plasma. *Thrombosis Research*, 2019. 182: p. 124-132.
60. Powers, J.C., et al., Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev*, 2002. 102(12): p. 4639-750.
61. Oleksyszyn, J. and J.C. Powers, Irreversible inhibition of serine proteases by peptidyl derivatives of alpha-aminoalkylphosphonate diphenyl esters. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. 161(1): p. 143-9.
62. Skorenski, M., et al., Phosphonate inhibitors of West Nile virus NS2B/NS3 protease. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2019. 34(1): p. 8-14.
63. Hedstrom, L., An overview of serine proteases. *Curr Protoc Protein Sci*, 2002. Chapter 21: p. Unit 21 10.
64. Hedstrom, L., Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev*, 2002. 102: p. 4501-4524.
65. Qiu, X., et al., Unique fold and active site in cytomegalovirus protease. *Nature*, 1996. 383(6597): p. 275-9.
66. Håkansson, K., A. H-J Wang, and C.G. Miller, The structure of aspartyl dipeptidase reveals a unique fold with a Ser-His-Glu catalytic triad. *PNAS*, 2000. 97(26): p. 14097-14102.
67. Ha, Y., Y. Akiyama, and Y. Xue, Structure and mechanism of rhomboid protease. *J Biol Chem*, 2013. 288(22): p. 15430-6.
68. Paetzel, M. and N.C. Strynadka, Common protein architecture and binding sites in proteases utilizing a Ser/Lys dyad mechanism. *Protein Sci*, 1999. 8(11): p. 2533-6.
69. Drag, M., et al., Aminopeptidase fingerprints, an integrated approach for identification of good substrates and optimal inhibitors. *J Biol Chem*, 2010. 285(5): p. 3310-8.
70. Wang, F., et al., Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* dipeptidyl aminopeptidase 1. *Mol Biochem Parasitol*, 2011. 175(1): p. 10-20.
71. Backes, B.J., et al., Synthesis of positional-scanning libraries of fluorogenic peptide substrates to define the extended substrate specificity of plasmin and thrombin. *Nat Biotechnol*, 2000. 18(2): p. 187-93.
72. Lesner, A., et al., Development of sensitive cathepsin G fluorogenic substrate using combinatorial chemistry methods. *Anal Biochem*, 2008. 375(2): p. 306-12.
73. Furka, A., et al., General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Int J Pept Protein Res*, 1991. 37(6): p. 487-93.
74. Lam, K.S., et al., A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature*, 1991. 354(6348): p. 82-4.

75. Houghten, R.A., et al., Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature*, 1991. 354(6348): p. 84-6.
76. Ostresh, J.M., et al., Peptide libraries: determination of relative reaction rates of protected amino acids in competitive couplings. *Biopolymers*, 1994. 34(12): p. 1681-9.
77. Rano, T.A., et al., A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE). *Chem Biol*, 1997. 4(2): p. 149-55.
78. Poreba, M. and M. Drag, Current Strategies for Probing Substrate Specificity of Proteases. *Current Medicinal Chemistry*, 2010. 17(33): p. 3968-3995.
79. Poreba, M., et al., Positional scanning substrate combinatorial library (PS-SCL) approach to define caspase substrate specificity. *Methods Mol Biol*, 2014. 1133: p. 41-59.
80. Smith, R.E., et al., Direct photometric or fluorometric assay of proteinases using substrates containing 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin. *Thromb Res*, 1980. 17(3-4): p. 393-402.
81. Maly, D.J., et al., Expedient solid-phase synthesis of fluorogenic protease substrates using the 7-amino-4-carbamoylmethylcoumarin (ACC) fluorophore. *J Org Chem*, 2002. 67(3): p. 910-5.
82. Harris, J.L., et al., Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(14): p. 7754-9.
83. Chen, S., J.J. Yim, and M. Bogoy, Synthetic and biological approaches to map substrate specificities of proteases. *Biol Chem*, 2019. 401(1): p. 165-182.
84. Marcondes, M.F., et al., Substrate specificity of mitochondrial intermediate peptidase analysed by a support-bound peptide library. *FEBS Open Bio*, 2015. 5: p. 429-36.
85. Damalanka, V.C., S.A. Wildman, and J.W. Janetka, Piperidine carbamate peptidomimetic inhibitors of the serine proteases HGFA, matriptase and hepsin. *Medchemcomm*, 2019. 10(9): p. 1646-1655.
86. Prudova, A., et al., Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2010. 9(5): p. 894-911.
87. Pop, C. and G.S. Salvesen, Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem*, 2009. 284(33): p. 21777-81.
88. Poreba, M., G.S. Salvesen, and M. Drag, Synthesis of a HyCoSuL peptide substrate library to dissect protease substrate specificity. *Nat Protoc*, 2017. 12(10): p. 2189-2214.
89. Poreba, M., et al., Unnatural amino acids increase activity and specificity of synthetic substrates for human and malarial cathepsin C. *Amino Acids*, 2014. 46(4): p. 931-43.
90. Rut, W., et al., Selective Substrates and Activity-Based Probes for Imaging of the Human Constitutive 20S Proteasome in Cells and Blood Samples. *J Med Chem*, 2018. 61(12): p. 5222-5234.

91. Kasperkiewicz, P., et al., Design of ultrasensitive probes for human neutrophil elastase through hybrid combinatorial substrate library profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(7): p. 2518-23.
92. Poreba, M., et al., Caspase selective reagents for diagnosing apoptotic mechanisms. *Cell Death Differ*, 2019. 26(2): p. 229-244.
93. Rut, W., et al., Extended substrate specificity and first potent irreversible inhibitor/activity-based probe design for Zika virus NS2B-NS3 protease. *Antiviral Res*, 2017. 139: p. 88-94.
94. Maggiora, L.L., C.W. Smith, and Z.Y. Zhang, A general method for the preparation of internally quenched fluorogenic protease substrates using solid-phase peptide synthesis. *J Med Chem*, 1992. 35(21): p. 3727-30.
95. Wysocka, M., et al., Substrate specificity of human matriptase-2. *Biochimie*, 2014. 97: p. 121-7.
96. Oliveira, L.C., et al., Internally quenched fluorescent peptide libraries with randomized sequences designed to detect endopeptidases. *Anal Biochem*, 2012. 421(1): p. 299-307.
97. Poreba, M., et al., Highly sensitive and adaptable fluorescence-quenched pair discloses the substrate specificity profiles in diverse protease families. *Sci Rep*, 2017. 7: p. 43135.
98. Groborz, K., et al., Internally quenched fluorogenic substrates with unnatural amino acids for cathepsin G investigation. *Biochimie*, 2019. 166: p. 103-111.
99. Kasperkiewicz, P., et al., Determination of extended substrate specificity of the MALT1 as a strategy for the design of potent substrates and activity-based probes. *Sci Rep*, 2018. 8(1): p. 15998.
100. Smith, M.M., L. Shi, and M. Navre, Rapid identification of highly active and selective substrates for stromelysin and matrilysin using bacteriophage peptide display libraries. *J Biol Chem*, 1995. 270(12): p. 6440-9.
101. Matthews, D.J. and J.A. Wells, Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display. *Science*, 1993. 260(5111): p. 1113-7.
102. Yi, L., et al., Engineering of TEV protease variants by yeast ER sequestration screening (YESS) of combinatorial libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(18): p. 7229-34.
103. Li, Q., et al., Profiling Protease Specificity: Combining Yeast ER Sequestration Screening (YESS) with Next Generation Sequencing. *ACS Chem Biol*, 2017. 12(2): p. 510-518.
104. Lopez-Otin, C. and C.M. Overall, Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(7): p. 509-19.
105. Overall, C.M., et al., Protease degradomics: mass spectrometry discovery of protease substrates and the CLIP-CHIP, a dedicated DNA microarray of all human proteases and inhibitors. *Biol Chem*, 2004. 385(6): p. 493-504.
106. Van Damme, P., et al., A review of COFRADIC techniques targeting protein N-terminal acetylation. *BMC Proc*, 2009. 3 Suppl 6: p. S6.
107. Vizovisek, M., et al., Current trends and challenges in proteomic identification of protease substrates. *Biochimie*, 2016. 122: p. 77-87.

108. Gevaert, K., et al., Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides. *Nat Biotechnol*, 2003. 21(5): p. 566-9.
109. Schilling, O. and C.M. Overall, Proteome-derived, database-searchable peptide libraries for identifying protease cleavage sites. *Nat Biotechnol*, 2008. 26(6): p. 685-94.
110. Gulcicek, E.E., et al., Proteomics and the analysis of proteomic data: an overview of current protein-profiling technologies. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2005. Chapter 13: p. Unit 13 1.
111. Deu, E., M. Verdoes, and M. Bogyo, New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. 19(1): p. 9-16.
112. Heal, W.P., T.H. Dang, and E.W. Tate, Activity-based probes: discovering new biology and new drug targets. *Chem Soc Rev*, 2011. 40(1): p. 246-57.
113. Fonovic, M. and M. Bogyo, Activity-based probes as a tool for functional proteomic analysis of proteases. *Expert Rev Proteomics*, 2008. 5(5): p. 721-30.
114. Sanman, L.E. and M. Bogyo, Activity-based profiling of proteases. *Annu Rev Biochem*, 2014. 83: p. 249-73.
115. Kessler, B.M., et al., Extended peptide-based inhibitors efficiently target the proteasome and reveal overlapping specificities of the catalytic beta-subunits. *Chem Biol*, 2001. 8(9): p. 913-29.
116. Bogyo, M., et al., Selective targeting of lysosomal cysteine proteases with radiolabeled electrophilic substrate analogs. *Chem Biol*, 2000. 7(1): p. 27-38.
117. Methot, N., et al., A caspase active site probe reveals high fractional inhibition needed to block DNA fragmentation. *J Biol Chem*, 2004. 279(27): p. 27905-14.
118. Bogyo, M., et al., Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the *Escherichia coli* homolog HslV by a new class of inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(13): p. 6629-34.
119. Cull, M.G. and P.J. Schatz, Biotinylation of proteins in vivo and in vitro using small peptide tags. *Methods Enzymol*, 2000. 326: p. 430-40.
120. de Boer, E., et al., Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(13): p. 7480-5.
121. Clarke, J.M., et al., Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. *J Microbiol Methods*, 2001. 46(3): p. 261-7.
122. Eggeling, C., A. Volkmer, and C.A. Seidel, Molecular photobleaching kinetics of Rhodamine 6G by one- and two-photon induced confocal fluorescence microscopy. *Chemphyschem*, 2005. 6(5): p. 791-804.
123. Greenbaum, D., et al., Chemical approaches for functionally probing the proteome. *Mol Cell Proteomics*, 2002. 1(1): p. 60-8.
124. Poreba, M., et al., The Activome: multiplexed probing of activity of proteolytic enzymes using mass cytometry-compatible activity-based probes (TOF-probes). *Journal of the American Chemical Society*, 2019. 142(39): p. 16704-16715.

125. Jessani, N., et al., Enzyme activity profiles of the secreted and membrane proteome that depict cancer cell invasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(16): p. 10335-40.
126. Greenbaum, D.C., et al., A role for the protease falcipain 1 in host cell invasion by the human malaria parasite. *Science*, 2002. 298(5600): p. 2002-6.
127. Eipper, S., et al., Lactoferrin Is an Allosteric Enhancer of the Proteolytic Activity of Cathepsin G. *PLoS One*, 2016. 11(3): p. e0151509.
128. Chaudhry, R., S.M. Usama, and H.M. Babiker, *Physiology, Coagulation Pathways*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
129. Mackman, N., R.E. Tilley, and N.S. Key, Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(8): p. 1687-93.
130. Grover, S.P. and N. Mackman, Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019. 39(3): p. 331-338.
131. Palta, S., R. Saroa, and A. Palta, Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth*, 2014. 58(5): p. 515-23.
132. Schmaier, A.H., Physiologic activities of the contact activation system. *Thromb Res*, 2014. 133 Suppl 1: p. S41-4.
133. Lowenberg, E.C., et al., Coagulation factor XI as a novel target for antithrombotic treatment. *J Thromb Haemost*, 2010. 8(11): p. 2349-57.
134. Emsley, J., P.A. McEwan, and D. Gailani, Structure and function of factor XI. *Blood*, 2010. 115(13): p. 2569-77.
135. Mann, K.G., Thrombin formation. *Chest*, 2003. 124(3 Suppl): p. 4S-10S.
136. Griffin, J.H., Blood coagulation. The thrombin paradox. *Nature*, 1995. 378(6555): p. 337-8.
137. Esmon, C.T., The protein C pathway. *Chest*, 2003. 124(3 Suppl): p. 26S-32S.
138. Negrier, C., M. Shima, and M. Hoffman, The central role of thrombin in bleeding disorders. *Blood Rev*, 2019. 38: p. 100582.
139. Rosendaal, F.R., Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet*, 1999. 353(9159): p. 1167-73.
140. Shen, G.X., Inhibition of thrombin: relevance to anti-thrombosis strategy. *Front Biosci*, 2006. 11: p. 113-20.
141. Griffin, J.H., B. Zlokovic, and J.A. Fernandez, Activated protein C: potential therapy for severe sepsis, thrombosis, and stroke. *Semin Hematol*, 2002. 39(3): p. 197-205.
142. Levi, M. and H. Ten Cate, Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med*, 1999. 341(8): p. 586-92.
143. Gailani, D. and G.J. Broze, Jr., Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science*, 1991. 253(5022): p. 909-12.
144. Puy, C., R.A. Rigg, and O.J. McCarty, The hemostatic role of factor XI. *Thromb Res*, 2016. 141 Suppl 2: p. S8-S11.
145. Wendelboe, A.M. and G.E. Raskob, Global Burden of Thrombosis: Epidemiologic Aspects. *Circ Res*, 2016. 118(9): p. 1340-7.
146. Doolittle, R.F., The evolution of vertebrate blood coagulation: A case of Yin and Yang. *Thromb Haemost*, 1993. 70: p. 24-28.

147. Jiang, Y. and R.F. Doolittle, The evolution of vertebrate blood coagulation as viewed from a comparison of puffer fish and sea squirt genomes. *PNAS*, 2003. 100(13): p. 7527–7532.
148. Ponczek, M. B., D. Gailani, and R.F. Doolittle, Evolution of the contact phase of vertebrate blood coagulation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2008. 6(11): p. 1876-1883.
149. Doolittle, R. F., Step-by-step evolution of vertebrate blood coagulation. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2009. 74: p. 35-40.
150. Doolittle, R. F., Y. Jiang, and J. Nand, Genomic evidence for a simpler clotting scheme in jawless vertebrates. *Journal of Molecular Evolution*, 2008. 66(2): p. 185-196.
151. Mather, T., et al., The 2.8 Å crystal structure of Gla-domainless activated protein C. *EMBO J*, 1996. 15(24): p. 6822-31.
152. Jiang, Y. and R.F. Doolittle, The evolution of vertebrate blood coagulation as viewed from a comparison of puffer fish and sea squirt genomes. *PNAS*, 2003. 100(13): p. 7527–7532.
153. Griffin, J.H., B. Zlokovic, and J.A. Fernandez, Activated protein C: potential therapy for severe sepsis, thrombosis, and stroke. *Semin Hematol*, 2002. 39(3): p. 197-205.
154. Pozzi, N., et al., Crystal structure of prothrombin reveals conformational flexibility and mechanism of activation. *Journal of Biological Chemistry*, 2013. 288(31): p. 22734-22744.
155. Davie, E. W. and J.D. Kulman, An overview of the structure and function of thrombin. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2006. 32: p. 3-15.
156. Venkateswarlu, D., et al., Structure and dynamics of zymogen human blood coagulation factor X. *Biophysical Journal*, 2002. 82(3): p. 1190-1206.
157. Polderdijk, S.G.I., T.P. Baglin, and J.A. Huntington, Targeting activated protein C to treat hemophilia. *Curr Opin Hematol*, 2017. 24(5): p. 446-452.
158. Jalbert, L. R., et al., Complete Protein C Deficiency Inactivation of the Gene for Anticoagulant Protein C Causes Lethal Perinatal Consumptive Coagulopathy in Mice. *J. Clin. Invest*, 1998. 102: p. 1481-1488.
159. Marlar, R. A. and A. Neumann, Neonatal Purpura Fulminans Due to Homozygous Protein C or Protein S Deficiencies. *Seminar in thrombosis and hemostasis*, 1990. 16(4): 299-309.
160. Mann, H.J., M.A. Short, and D.E. Schlichting, Protein C in critical illness. *Am J Health Syst Pharm*, 2009. 66(12): p. 1089-96.
161. Aliter, K.F. and R.A. Al-Horani, Thrombin Inhibition by Argatroban: Potential Therapeutic Benefits in COVID-19. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2021. 35(2): p. 195-203.
162. Chen, B., et al., Thrombin activity associated with neuronal damage during acute focal ischemia. *J Neurosci*, 2012. 32(22): p. 7622-31.
163. Cantrell, R. and J.S. Palumbo, The thrombin-inflammation axis in cancer progression. *Thromb Res*, 2020. 191 Suppl 1: p. S117-S122.

164. Turpie, A.G.G., Oral, direct factor Xa inhibitors in development for the prevention and treatment of thromboembolic diseases. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2007. 27: p. 1238-1247.
165. Mannucci, P. M., S. Duga, and F. Peyvandi, Recessively inherited coagulation disorders. *Blood*, 2004. 104(5): 1243-1252.
166. Uprichard, J. and D.J. Perry, Factor X deficiency. *Blood Reviews*, 2002. 16(2): p. 97-110.
167. Yang, T.L., et al., The structure and function of murine factor V and its inactivation by protein C. *Blood*, 1998. 91(12): p. 4593-9.
168. Kamata, K., et al., Structural basis for chemical inhibition of human blood coagulation factor Xa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(12): p. 6630-5.
169. Lottenberg, R., et al., The action of thrombin on peptide p-nitroanilide substrates. Substrate selectivity and examination of hydrolysis under different reaction conditions. *Biochim Biophys Acta*, 1983. 742(3): p. 539-57.
170. Gallwitz, M., et al., The extended cleavage specificity of human thrombin. *PLoS One*, 2012. 7(2): p. e31756.
171. Le Bonniec, B.F., et al., Characterization of the P2' and P3' specificities of thrombin using fluorescence-quenched substrates and mapping of the subsites by mutagenesis. *Biochemistry*, 1996. 35(22): p. 7114-22.
172. Marque, P.E., et al., The role of Glu(192) in the allosteric control of the S(2)' and S(3)' subsites of thrombin. *J Biol Chem*, 2000. 275(2): p. 809-16.
173. Bianchini, E.P., et al., Mapping of the catalytic groove preferences of factor Xa reveals an inadequate selectivity for its macromolecule substrates. *J Biol Chem*, 2002. 277(23): p. 20527-34.
174. Nar, H., The role of structural information in the discovery of direct thrombin and factor Xa inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*, 2012. 33(5): p. 279-88.
175. Polderdijk, S. G. I. and J.A. Huntington, Identification of serpins specific for activated protein C using a lysate-based screening assay. *Scientific Reports*, 2018. 8(1): p. 1-12.
176. Polderdijk, S. G. I., et al., Design and characterization of an APC-specific serpin for the treatment of hemophilia. *Blood*, 2017. 129(1): p. 105-113.
177. Bode, W., et al., The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J*, 1989. 8(11): p. 3467-75.
178. Karle, M., W. Knecht, and Y. Xue, Discovery of benzothiazole guanidines as novel inhibitors of thrombin and trypsin IV. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012. 22(14): p. 4839-43.
179. Hoffmann-Roder, A., et al., Mapping the fluorophilicity of a hydrophobic pocket: synthesis and biological evaluation of tricyclic thrombin inhibitors directing fluorinated alkyl groups into the p pocket. *ChemMedChem*, 2006. 1(11): p. 1205-15.
180. Kawabata, S., et al., Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood-clotting proteases and trypsin. *Eur J Biochem*, 1988. 172(1): p. 17-25.
181. Petrassi, H.M., et al., A strategy to profile prime and non-prime proteolytic substrate specificity. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005. 15(12): p. 3162-6.

182. Gosalia, D.N., et al., Profiling serine protease substrate specificity with solution phase fluorogenic peptide microarrays. *Proteomics*, 2005. 5(5): p. 1292-8.
183. Butenas, S., V. Drungilaite, and K.G. Mann, Fluorogenic substrates for activated protein C: substrate structure-efficiency correlation. *Anal Biochem*, 1995. 225(2): p. 231-41.
184. Rawlings, N.D., et al., MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*, 2014. 42(Database issue): p. D503-9.
185. Fay, P. J., T.M. Smudzin, and F.J. Walker, Activated protein C-catalyzed inactivation of human factor VIII and factor VIII(a). Identification of cleavage sites and correlation of proteolysis with cofactor activity. *Journal of Biological Chemistry*, 1991. 266(30): p. 20139-20145.
186. Safa, O., et al., Factor VIIa/tissue factor generates a form of factor V with unchanged specific activity, resistance to activation by thrombin, and increased sensitivity to activated protein C. *Biochemistry*, 1999. 38(6): p. 1829-1837.
187. Warren, D. L., J.H. Morrissey, and P.F. Neuenschwander, Proteolysis of blood coagulation factor VIII by the factor VIIa-tissue factor complex: Generation of an inactive factor VIII cofactor. *Biochemistry*, 1999. 38(20): p. 6529-6536.
188. Naito, K. and K. Fujikawa, Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. *Journal of Biological Chemistry*, 1991. 266(12): p. 7353-7358.
189. Hackeng, T. M., et al., Protein C activation on endothelial cells by prothrombin activation products generated in situ : meizothrombin is a better protein C activator than α -thrombin. *Biochem. J*, 1996. 319: 399-405.
190. Lord, S. T., et al., Analysis of fibrinogen A α -fusion proteins. Mutants which inhibit thrombin equivalently are not equally good substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 1990. 265(2): p. 838-843.
191. Hunfeld, A., et al., Detection of a novel plasma serine protease during purification of vitamin K-dependent coagulation factors. *FEBS Lett*, 1999. 456(2): p. 290-4.
192. Espafia, F., M. Berrettini, and J.H. Griffin, Purification and characterization of plasma protein C inhibitor. *Thrombosis research*, 1989. 55: p. 369-384.
193. Suzuki, K., et al., Mechanism of Inhibition of Activated Protein C. *Biochem.*, 1984. 95: p. 187-195.
194. Finley, A., and C. Greenberg, Heparin sensitivity and resistance: Management during cardiopulmonary bypass. *Anesthesia and Analgesia*, 2013. 116(6): 1210-1222.
195. Huang, X., et al., Basis for the specificity and activation of the serpin protein Z-dependent proteinase inhibitor (ZPI) as an inhibitor of membrane-associated factor Xa. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. 285(26): p. 20399-20409.
196. Chowdary, P., et al., Safety and pharmacokinetics of anti-TFPI antibody (concizumab) in healthy volunteers and patients with hemophilia: A randomized first human dose trial. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2015. 13(5): p. 743-754.
197. Sehgal, A., et al., An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nature Medicine*, 2015. 21(5): p. 492-497.

198. Prince, R., et al., Targeting anticoagulant protein S to improve hemostasis in hemophilia. *Blood*, 2018. 131(12): p. 1360-1371.
199. Zhao, X. Y., et al., Targeted inhibition of activated protein C by a non-active-site inhibitory antibody to treat hemophilia. *Nature Communications*, 2020. 11: p. 1-14.
200. Gal, S. W., et al., Selection of a RNA aptamer that binds to human activated protein C and inhibits its protease function. *Eur. J. Biochem.*, 1998. 252: p. 553-562.
201. Cvirn, G., S. Gallistl, and W. Muntean, Alpha-2-Macroglobulin Inhibits the Anticoagulant Action of Activated Protein C in Cord and Adult Plasma. *Haemostasis*, 2001. 31: p. 1-11.
202. De Nanteuil, G., et al., Low molecular weight activated protein C inhibitors as a potential treatment for hemophilic disorders. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006. 49(17): p. 5047-5050.
203. Raskob, G. E., et al., Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2014. 34(11): p. 2363-2371.
204. Franchini, M., et al., The evolution of anticoagulant therapy. *Blood Transfus.*, 2016. 14: p. 175-84.
205. Szekely, O., M. Borgi, and G.Y.H. Lip, Factor XI inhibition fulfilling the optimal expectations for ideal anticoagulation. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2019. 24(1): p. 55-61.
206. De Caterina, R., et al., General mechanisms of coagulation and targets of anticoagulants (Section I). Position Paper of the ESC Working Group on Thrombosis--Task Force on Anticoagulants in Heart Disease. *Thromb Haemost*, 2013. 109(4): p. 569-79.
207. Yeh, C.H., K. Hogg, and J.I. Weitz, Overview of the new oral anticoagulants: opportunities and challenges. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. 35(5): p. 1056-65.
208. Di Nisio, M., S. Middeldorp, and H.R. Büller, H. R. Direct Thrombin Inhibitors. *N Engl J Med*, 2005. 353: p. 1028-1040.
209. Akwaa, F. and A.C. Spyropoulos, Novel oral anticoagulants: a review of the literature and considerations in special clinical situations. *Hospital Practice*, 2013. 41(1): p. 8-18.
210. Al-Horani, R.A., Potential Therapeutic Roles for Direct Factor Xa Inhibitors in Coronavirus Infections. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2020. 20(6): p. 525-533.
211. Mehta, A. Y., Y. Jin, and U.R. Desai, An update on recent patents on thrombin inhibitors (2010-2013). *Expert Opin. Ther. Patents*, 2013. 24(1): p. 1-21.
212. Brighton, T. A., The direct thrombin inhibitor melagatran/ximelagatran. *Medical Journal of Australia*, 2004. 181(8): p. 432-437.
213. O'Brien, P. J. and L. Mureebe, Direct thrombin inhibitors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2012. 17(1): p. 5-11.
214. Bock, L.C., Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, 1992. 355: p. 564-566.
215. Olson, S. T., R. Swanson, and M. Petitou, Specificity and selectivity profile of EP217609: A new neutralizable dual-action anticoagulant that targets thrombin and factor Xa. *Blood*, 2012. 119(10): p. 2187-2195.

216. Petitou, M., et al., From heparin to EP217609: The long way to a new pentasaccharide-based neutralisable anticoagulant with an unprecedented pharmacological profile. *Thrombosis and Haemostasis*, 2009. 102: p. 804-810.
217. Gueret, P., et al., First in man study of EP217609, a new long-acting, neutralisable parenteral antithrombotic with a dual mechanism of action. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2016. 72(9): p. 1041-1050.
218. Mohammed, B.M., et al., An update on factor XI structure and function. *Thromb Res*, 2018. 161: p. 94-105.
219. Gailani, D. and S.B. Smith, Structural and functional features of factor XI. *J Thromb Haemost*, 2009. 7 Suppl 1: p. 75-8.
220. Gailani, D. and G.J. Broze, Jr., Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science*, 1991. 253(5022): p. 909-12.
221. Gailani, D. and J. Emsley, Toward a better understanding of factor XI activation. *J Thromb Haemost*, 2019. 17(12): p. 2016-2018.
222. Schaefer, M., et al., Allosteric Inhibition as a New Mode of Action for BAY 1213790, a Neutralizing Antibody Targeting the Activated Form of Coagulation Factor XI. *J Mol Biol*, 2019. 431(24): p. 4817-4833.
223. Al-Horani, R.A. and D.K. Afosah, Recent advances in the discovery and development of factor XI/XIa inhibitors. *Med Res Rev*, 2018. 38(6): p. 1974-2023.
224. Berber, E., Molecular characterization of FXI deficiency. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2011. 17(1): p. 27-32.
225. Gotovac Jercic, K., et al., Congenital factor XI deficiency caused by a novel F11 missense variant: a case report. *Croat Med J*, 2020. 61(1): p. 62-65.
226. Gailani, D. and A. Gruber, Factor XI as a Therapeutic Target. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. 36(7): p. 1316-22.
227. Yang, D.T., et al., Elevated factor XI activity levels are associated with an increased odds ratio for cerebrovascular events. *Am J Clin Pathol*, 2006. 126(3): p. 411-5.
228. Meijers, J.C., et al., High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med*, 2000. 342(10): p. 696-701.
229. Cushman, M., et al., Coagulation factors IX through XIII and the risk of future venous thrombosis: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology. *Blood*, 2009. 114(14): p. 2878-2883.
230. Doggen, C.J., F.R. Rosendaal, and J.C. Meijers, Levels of intrinsic coagulation factors and the risk of myocardial infarction among men: Opposite and synergistic effects of factors XI and XII. *Blood*, 2006. 108(13): p. 4045-51.
231. Gailani, D., C.E. Bane, and A. Gruber, Factor XI and contact activation as targets for antithrombotic therapy. *J Thromb Haemost*, 2015. 13(8): p. 1383-95.
232. Muller, F., D. Gailani, and T. Renne, Factor XI and XII as antithrombotic targets. *Curr Opin Hematol*, 2011. 18(5): p. 349-55.
233. McRae, B.J., et al., Mapping the active sites of bovine thrombin, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa, plasma kallikrein, and trypsin with amino acid and peptide thioesters: development of new sensitive substrates. *Biochemistry*, 1981. 20(25): p. 7196-206.

234. Katayama, K., et al., Comparison of amino acid sequence of bovine coagulation Factor IX (Christmas Factor) with that of other vitamin K-dependent plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(10): p. 4990-4.
235. Cho, K., et al., Active-Site Mapping of Bovine and Human Blood Coagulation Serine Proteases Using Synthetic Peptide 4-Nitroanilide and Thio Ester Substrates. *Biochemistry*, 1984. 23: p. 644-650.
236. Fredenburgh, J.C., P.L. Gross, and J.I. Weitz, Emerging anticoagulant strategies. *Blood*, 2017. 129(2): p. 147-154.
237. Weitz, J.I. and J.C. Fredenburgh, 2017 Scientific Sessions Sol Sherry Distinguished Lecture in Thrombosis: Factor XI as a Target for New Anticoagulants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018. 38(2): p. 304-310.
238. Lorentz, C.U., et al., Contact Activation Inhibitor and Factor XI Antibody, AB023, Produces Safe, Dose-Dependent Anticoagulation in a Phase 1 First-In-Human Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019. 39(4): p. 799-809.
239. David, T., et al., Factor XIa-specific IgG and a reversal agent to probe factor XI function in thrombosis and hemostasis. *Sci Transl Med*, 2016. 8(353): p. 353ra112.
240. Seligsohn, U., Factor XI deficiency in humans. *J Thromb Haemost*, 2009. 7 Suppl 1: p. 84-7.
241. Salomon, O., et al., Patients with severe factor XI deficiency have a reduced incidence of deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost*, 2011. 105(2): p. 269-73.
242. Salomon, O., et al., Reduced incidence of ischemic stroke in patients with severe factor XI deficiency. *Blood*, 2008. 111(8): p. 4113-7.
243. Mackman, N., Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*, 2008. 451(7181): p. 914-8.
244. Tucker, E.I., et al., Inhibition of factor XI activation attenuates inflammation and coagulopathy while improving the survival of mouse polymicrobial sepsis. *Blood*, 2012. 119(20): p. 4762-8.
245. Luo, D., et al., Factor XI-deficient mice display reduced inflammation, coagulopathy, and bacterial growth during listeriosis. *Infect Immun*, 2012. 80(1): p. 91-9.
246. Kossmann, S., et al., Platelet-localized FXI promotes a vascular coagulation-inflammatory circuit in arterial hypertension. *Sci Transl Med*, 2017. 9(375).
247. Buller, H.R., et al., Factor XI antisense oligonucleotide for prevention of venous thrombosis. *N Engl J Med*, 2015. 372(3): p. 232-40.
248. Bickmann, J.K., et al., Novel targets for anticoagulants lacking bleeding risk. *Curr Opin Hematol*, 2017. 24(5): p. 419-426.
249. Chen, Z., D. Seiffert, and B. Hawes, Inhibition of Factor XI activity as a promising antithrombotic strategy. *Drug Discov Today*, 2014. 19(9): p. 1435-9.
250. Tucker, E. I., et al., Prevention of vascular graft occlusion and thrombus-associated thrombin generation by inhibition of factor XI. *Blood*, 2009. 113(4): p. 936-944.
251. Cheng, Q., et al., A role for factor XIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo. *Blood*, 2010. 116(19): p. 3981-3989.
252. Zhang, H., et al., Inhibition of the intrinsic coagulation pathway factor XI by antisense oligonucleotides: A novel antithrombotic strategy with lowered bleeding risk. *Blood*, 2010. 116(22): p. 4684-4692.

253. Lazarova, T. I., et al., Synthesis and in vitro biological evaluation of aryl boronic acids as potential inhibitors of factor XIa. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2006. 16(19): p. 5022-5027.
254. Deng, H., et al., Synthesis, SAR exploration, and X-ray crystal structures of factor XIa inhibitors containing an α -ketothiazole arginine. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2006. 16(11): p. 3049-3054.
255. Wong, P. C., et al., A small-molecule factor XIa inhibitor produces antithrombotic efficacy with minimal bleeding time prolongation in rabbits. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2011. 32(2): p. 129-137.
256. Al-Horani, R. A., et al., Sulfated pentagalloylglucoside is a potent, allosteric, and selective inhibitor of factor XIa. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013. 56(3): p. 867-878.
257. Buchanan, M. S., et al., Clavatadine A, A natural product with selective recognition and irreversible inhibition of factor XIa. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008. 51(12): p. 3583-3587.
258. Ma, D., et al., Desmolaris, a novel factor XIa anticoagulant from the salivary gland of the vampire bat (*Desmodus rotundus*) inhibits inflammation and thrombosis in vivo. *Blood*, 2013. 122(25): p. 4094-4106.
259. Larsson, M., et al., A Factor XIIa Inhibitory Antibody Provides Thromboprotection in Extracorporeal Circulation Without Increasing Bleeding Risk, 2014. 6(222): p. 1-15.
260. Matafonov, A., et al., Factor XII inhibition reduces thrombus formation in a primate thrombosis model. *Blood*, 2014. 123(11): p. 1739-1746.
261. Revenko, A. S., et al., Selective depletion of plasma prekallikrein or coagulation factor XII inhibits thrombosis in mice without increased risk of bleeding. *Blood*, 2011. 118(19): p. 5302-5311.
262. Baeriswyl, V., et al., Development of a selective peptide macrocycle inhibitor of coagulation factor XII toward the generation of a safe antithrombotic therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013. 56(9): p. 3742-3746.
263. Woodruff, R. S., et al., Inhibiting the intrinsic pathway of coagulation with a factor XII-targeting RNA aptamer. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2013. 11(7): p. 1364-1373.
264. Rut, W., et al., Profiling of flaviviral NS2B-NS3 protease specificity provides a structural basis for the development of selective chemical tools that differentiate Dengue from Zika and West Nile viruses. *Antiviral Research*, 2020. 175: p. 1-9.
265. Kasperkiewicz, P., et al., Toolbox of Fluorescent Probes for Parallel Imaging Reveals Uneven Location of Serine Proteases in Neutrophils. *Journal of the American Chemical Society*, 2017. 139(29): p. 10115-10125.
266. Ng, N.M., R.N. Pike, and S.E. Boyd, Subsite cooperativity in protease specificity. *Biol Chem*, 2009. 390(5-6): p. 401-7.
267. Poreba, M., et al., Positional scanning substrate combinatorial library (PS-SCL) approach to define caspase substrate specificity. *Methods Mol Biol*, 2014. 1133: p. 41-59.

268. Janiszewski, T., et al., Noninvasive optical detection of granzyme B from natural killer cells with enzyme-activated fluorogenic probes. *J Biol Chem*, 2020. 295(28): p. 9567-9582.
269. Poreba, M., et al., Selective imaging of cathepsin L in breast cancer by fluorescent activity-based probes. *Chemical Science*, 2018. 9(8): p. 2113-2129.
270. Sivaraman, A., et al., Synthesis and Structure-Activity Relationships of Arylsulfonamides as AIMP2-DX2 Inhibitors for the Development of a Novel Anticancer Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2020. 63(10): p. 5139-5158.
271. Carreon, J.R., et al., Cyanine dye conjugates as probes for live cell imaging. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007. 17(18): p. 5182-5.
272. Simmons, J. and J.F. Pittet, The coagulopathy of acute sepsis. *Current Opinion in Anaesthesiology*. Lippincott Williams and Wilkins, 2015. 22(2): p. 227-236.
273. Shi, L., et al., Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J Exp Med*, 1992. 176(6): p. 1521-9.
274. Furie, B. and B.C. Furie, The molecular basis of blood coagulation. *Cell*, 1988. 53(4): p. 505-18.
275. Page, M.J., et al., Non-invasive imaging and cellular tracking of pulmonary emboli by near-infrared fluorescence and positron-emission tomography. *Nat Commun*, 2015. 6: p. 8448.
276. Jin, X., et al., A label-free fluorescence assay for thrombin activity analysis based on fluorescent protein and gold nanoparticles. *Analytical Methods*, 2016. 8(18): p. 3691-3697.
277. Jaffer, F.A., et al., In vivo imaging of thrombin activity in experimental thrombi with thrombin-sensitive near-infrared molecular probe. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22(11): p. 1929-35.
278. Bajzar, L. and M. Nesheim, The effect of activated protein C on fibrinolysis in cell-free plasma can be attributed specifically to attenuation of prothrombin activation. *Journal of Biological Chemistry*, 1993. 268(12): p. 8608-8616.
279. Kisiel, W., Human plasma protein C. Isolation, characterization, and mechanism of activation by α -thrombin. *Journal of Clinical Investigation*, 1979. 64(3): p. 761-769.
280. Briet, E., et al., Cleavage and activation of human prothrombin by echis carinatus venom. *Thrombosis research*, 1982. 27: p. 591-600.
281. Jesty, J. and Y. Nemerson, The Activation of Bovine Coagulation Factor X. *Methods Enzymol.*, 1976. 45: p. 95-107.
282. Esmon, N. L., W.G. Owen, and C.T. Esmon, Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Journal of Biological Chemistry*, 1982. 257(2): p. 859-864.
283. Laemmli, U.K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 1970. 227: p. 680-685.
284. Gailani, D., M-F. Sun, and Y. Sun, A Comparison of Murine and Human Factor XI. *Blood*, 1997. 90(3): p. 1055-1064.