

Funksionele beskrywing van 'n faktor VIIa inhiberende peptied, IP-7, geselekteer deur faagblootleggingstegnologie

SM MEIRING*, CE ROETS** & PN BADENHORST

Departement Hematologie en Selbiologie, Fakulteit Gesondheidswetenskappe, Universiteit van die Vrystaat, Posbus 339 (G2), Bloemfontein, 9300

* Persoon aan wie korrespondensie gerig moet word.

** Huidige adres: Farmovs: Parexel, Privaat sak X09, Brandhof, 9324

UITTREKSEL

Die tegniek van faagblootlegging is gebruik om 'n sikliese heptapeptied te selekteer wat met weefselfaktor (WF) kompeteer vir binding aan stollingsfaktor VIIa. Die aminosuurvolgorde van die peptied is Cys-Ala-Trp-Pro-His-Thr-Pro-Asp-Cys (C-AWPHTPD-C) en dit verleng die protrombientyd (PT) op 'n konsentrasie-afhanklike wyse. Die peptied beperk plaatjieklewing aan beide menslike endoteelsel- en weefselfaktormatrikse in 'n vloeikamermodel onder arteriële vloeitoestande. Die peptied funksioneer as 'n volledig mededingende inhibeerder van faktor VIIa met 'n inhibisiekonstante (K_i) van 123,2 μM . In sy huidige vorm is die peptied waarskynlik nie sterk genoeg om verder as antitrombotiese middel ontwikkel te word nie, maar verskillende strategieë kan gevolg word om die werking daarvan te versterk.

ABSTRACT

Functional characterisation of a factor VIIa inhibiting peptide, IP-7 selected by phage display technology

By using the technique of phage display, we selected a cyclic heptapeptide sequence Cys-Ala-Trp-Pro-His-Thr-Pro-Asp-Cys (C-AWPHTPD-C) that competes with tissue factor for binding to coagulation factor VII. This peptide prolongs the prothrombin time (PT) in a concentration dependent way. It also reduces platelet adhesion to both human endothelial cell and tissue factor matrixes in a flow chamber under arterial flow conditions. Furthermore, it acts as a full competitive inhibitor of factor VIIa with an inhibition constant (K_i) of 123,2 μM . In its current form the peptide is probably not sufficiently potent for development as an antithrombotic agent, but different strategies could be followed to reinforce its performance.

INLEIDING

Bloedstolling begin met die beskadiging van 'n bloedvat en die blootstelling van sirkulerende bloed aan weefselfaktor (WF) in die subendoteel. Stollingsfaktor VII (FVII) wat in die bloed sirkuleer, bind aan WF om 'n FVII/WF-kompleks te vorm. Hierdie kompleks aktiveer faktor X wat op sy beurt protrombien aktiveer om trombien te vorm. Trombien skakel fibrinogeen na fibrien om en aktiveer bloedplaatjies om 'n trombus of stolsel te vorm.¹

Ten spyte van jare se navorsing is daar slegs twee antistolmiddels wat ruimskots deur dokters gebruik word, naamlik kumarien en heparien. Kumarien versteur die funksionering van vitamien K-afhanklike proteïene wat beide pro-stollingsfaktore (trombien en faktore X, IX en VII) en anti-stollingsfaktore (proteïene C en S) insluit, terwyl heparien die inhibisie van trombien en faktor Xa deur antitrombien III bevorder. Die nieselektiewe inhibisie van stolling deur beide hierdie antistolmiddels is waarskynlik verantwoordelik vir die onvermoë daarvan om 'n terapeutiese balans tussen trombose en hemostase te handhaaf.^{2,3}

Tans word baie aandag bestee aan die ontwikkeling van middels wat faktor X en trombien direk inhibeer. Die feit dat faktor VII hoër op in die stollingsbaan funksioneer,

betekende dat daar teoreties minder inhibeerder nodig is om stolling op hierdie vlak te stuit. Die vorming van die FVIIa/WF-kompleks lei die stollingsproses in en bied 'n goeie teken vir die ontwikkeling van antistollingsmiddels. Weefselfaktorbaaninhibeerder (WFBI) is 'n natuurlike inhibeerder van FVIIa/WF en sy werking is van faktor Xa afhanklik.⁴ Alhoewel daar nie FVIIa-inhibeerders kommersieel beskikbaar is nie, is dit al voorheen verken.^{5,6}

Verbindings wat die binding van WF aan FVIIa blokkeer, sal die aktivering van faktor X verhoed en aldus die vorming van 'n stolsel of trombus bekamp. Ons het 'n studie ontwerp om peptidinhiberders van FVIIa te ontwikkel deur van faagblootleggingstechnologie gebruik te maak.

Die tegniek van faagblootlegging maak die sifting van groot getalle faagklone moontlik. Meer as 'n miljard verskillende peptiedvolgordes kan op die manier gesif word en dit gee aan faagblootlegging 'n voordeel bo ander metodes.⁷ Ons het besluit om 'n kort oligonukleotiede te selekteer omdat klein peptiede minder immunogenies is.⁸

Verskillende FVIIa-bindende faagkolonies is getoets vir hulle vermoë om FVIIa te inhibeer. Die DNS-volgorde van dié wat die sterkste inhibisie getoon het, is bepaal en ooreenstemmende peptiede gesintetiseer. Op die manier is 'n sikliese heptapeptied met die volgorde C-AWPHTPD-C gesintetiseer en deur middel van 'n protrombientyd (PT) tipeer. Ons het ook die peptied se kinetiese eienskappe ten opsigte van FVIIa-inhibisie bepaal en die effek daarvan op plaatjieklewing aan endoteelselle en WF gemeet.

METODES

1. Seleksie van faktor VIIa-bindende fage

Die faagblootleggingstechniek wat gebruik is, is reeds volledig beskryf.⁹ Twee peptiedblootleggingsbiblioteke, 'n sikliese heptameer- en 'n lineêre dodekameerbiblioteek (New England Biolabs, Beverly, MA, VSA) is gebruik. Twintig μg FVIIa (ADI, Greenwich, CT, VSA) opgelos in 1 ml fosfaatgebufferde fisiologiese soutoplossing (PBS) is oornag by 4°C aan 'n immuunbuis (Nunc, IL, VSA) gebind. Fage (2×10^{11}) van elke biblioteek in PBS is tot die buisies toegevoeg en daarna vir 1½ uur by kamertemperatuur geïnkubeer om sodoende aan die faktor VIIa te bind. Die ongebonde fage is afgewas en die FVIIa-bindende fage niespesifiek met 'n sterk suuroplossing (0,2 M glisien by pH 2) geëluëer. Drie seleksierondes is uitgevoer. Tydens die tweede en derde rondte is die VIIa-bindende fage spesifiek met 10 μg van 'n muis-anti-mens-FVIIa-monoklonale antiliggam (ADI, Greenwich, CT, VSA) geëluëer. Die FVIIa-bindende fage is na elke rondte vermeerder deur log-fase *Escherichia coli* (*E.coli*) selle oornag te infekteer en te suiwer deur twee poliëtilenglikol-presipitasies.

Om enkel VIIa-bindende kolonies voor te berei, is seriële tienvoudige verdunnings van 'n fraksie van die geëluëerde fage gemaak en uitgeplaas. Eenhonderd vier-en-veertig (3 X 48) enkel kolonies van elke biblioteek is na die derde seleksieronde uitgekie en oornag by 37°C in *E. coli*-selle gekweek. Die supernatante, wat die geamplifiseerde fage bevat, is met behulp van 'n bindings-ELISA vir binding aan faktor VIIa getoets.

a. Bindings-ELISA

'n 96-putjie ELISA-plaat is oornag met 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FVIIa by 4°C bevestig. Na blokkering met 4% afgeroomde melk (DIFCO, Detroit, MI, VSA) in PBS, is die supernatante (100 μl) van die gekweekte kolonies by die putjies toegevoeg en vir 2 uur by kamertemperatuur geïnkubeer. 'n Peperwortelperoksidase-gekonjugeerde anti-faagantiliggam (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, VSA), is bygevoeg om die FVIIa-bindende fage op te spoor. Ses kolonies van elke

biblioteek het sterk binding getoon en is verder gekweek. Verdunningsreekse van bogenoemde 12 kolonies (ses van elke biblioteek) is vir konsentrasie-afhanklike binding aan FVIIa in 'n verdunnings-ELISA getoets.

b. Inhibisie-ELISA

'n Inhibisie-ELISA is gedoen om te bepaal of WF in staat is om te verhoed dat die twaalf kolonies aan FVIIa bind. Verskillende konsentrasies WF (ADI, Greenwich, CT, VSA) is by die FVIIa-bedeekte putjies gevoeg voordat die fage bygevoeg is. Die res van die ELISA is uitgevoer soos bo beskryf.

c. Protrombientyd (PT)

Die PT is gedoen deur 100 μl normale mensplasma by 50 μl van verskillende konsentrasies van die twaalf sterkste FVIIa-bindende fage te voeg en vir 10 min te inkubeer. Die faagkonsentrasies het van 1×10^9 tot $2,2 \times 10^{12}$ fage gewissel. Daarna is 200 μl weefselfaktor (Innovin van Dade Behring, Marburg, Duitsland) bygevoeg en die stolyd met 'n SStart@4 stollingsmeter (Diagnostica Stago, Asnieres, Frankryk) gemeet.

2. Nukleotiedvolgordebepaling

DNS is van beide die kolonies wat die PT verleng het, voorberei en die DNS-volgorde is met behulp van die DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Premix Kitsstel (Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ, VSA) bepaal. 'n Sikliese heptapeptied met dieselfde volgorde as die blootgelegde peptied op die sikliese kolonie is deur ADI, Greenwich, GT, VSA, gesintetiseer. Ons het die peptied IP-7 genoem.

3. Peptiedanalise

a. Protrombientyd (PT)

Die effek wat drie verskillende peptiedkonsentrasies (1,17mM; 0,58 mM; en 0,295 mM) op die PT het, is bepaal. PBS en 'n peptied wat nie aan FVII bind nie is as negatiewe kontrole gebruik. Die PT is gedoen soos bo beskryf.

b. Perfusiestudies met endoteelselle

Die antitrombotiese effek van die peptied IP-7 is met 'n vloekamer, soos deur Sakariassen beskryf, getoets.¹⁰ Thermanox plastiese dekglasies (Nunc, IL, VSA) is met menslike endoteelselle bedek wat goedgunstiglik geskenk is deur E.W. Ades en T.J. Lawley van die Centres for Disease Control and Prevention and Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, VSA.

Drie verskillende peptiedkonsentrasies (2,34 μM ; 4,7 μM ; en 9,35 μM) is met 10 ml bloed vir 10 minute by 37°C geïnkubeer. Konstante bloedvloei is met 'n peristaltiese pomp gehandhaaf en die bloed is vir 5 minute oor die dekglasies hersirkuleer. Verskillende skuiftempo's van 1000 s^{-1} en 200 s^{-1} is gebruik. Die dekglasies is daarna verwyder, met HEPES buffer gespoel, in metanol fikseer en volgens die May-Grünwald-Giemsametode gekleur. Dertig velde per dekglasie is ontleed en die persentasie plaatjiebedekking is met behulp van 'n Zeiss ligmikroskoop gemeet.^{11,12}

c. *Perfusiestudies met weefselfaktor*

Die dekglasies is met 100 μl weefselfaktor (Innovin van Dade Behring, Marburg, Duitsland) bedek. Die perfusiestudies is uitgevoer soos hierbo beskryf, behalwe dat die skuiftempo's in hierdie geval 200 s^{-1} , 650 s^{-1} en 1300 s^{-1} was. Finale peptiedkonsentrasies van 29,2 μM ; 58,5 μM en 117 μM is gebruik.

d. *In vitro-ensieminhibisie*

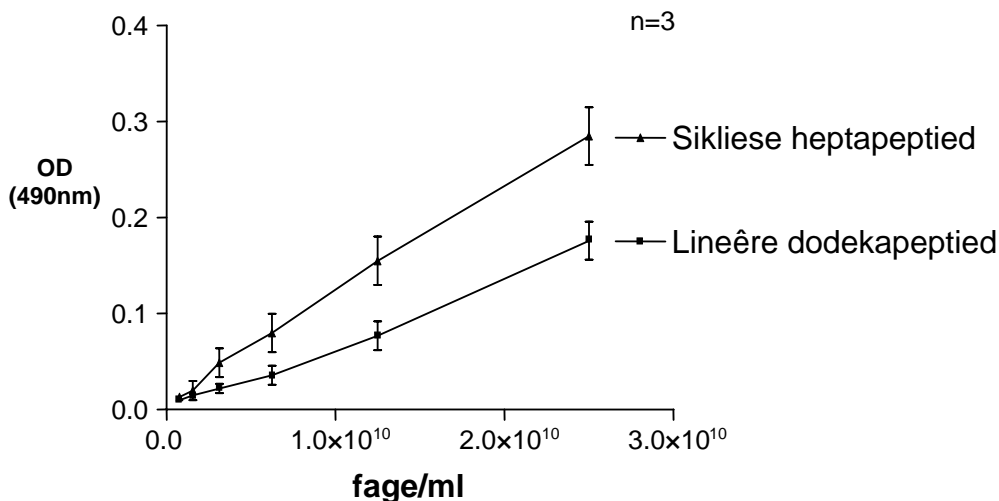
Die ensiemkinetika van die inhibisie van Faktor VIIa met peptied IP-7 is met behulp van chromogeniese substraathidrolise bepaal. Verskeie kinetiese reaksies is uitgevoer met peptiedkonsentrasies wat van 0 tot 0.456 mM gewissel het en waarby verskillende konsentrasies van die chromogeniese substraat van faktor VIIa (Spectrosyme FVIIa van American Diagnostica, VSA) gevoeg is. Die substraatkonsentrasies het gewissel van 0.56 tot 0 mM. 'n Optimale FVIIa konsentrasie van 400 nM is gebruik en Innovin (Dade Behring, Marburg, Duitsland) is as bron van WF gebruik. Die totale reaksievolume was 200 μl en al die reagense is in die reaksiebuffer (0.05 M Tris, 0.1 M NaCl pH 8.4) verdun. Chromogeniese substraathidrolise is vir 40 minute by 'n golflengte van 405 nm gevolg en deur middel van 'n EL312e mikroplaat biokinetiese leser (Bio-tek instruments, Vermont, VSA) gelees.

Die kinetiese parameters K_m en V_m by elke peptiedkonsentrasie is bereken deur gebruik te maak van enkelplekbinding nielineêre regressie. Om die tipe inhibisie van die peptied te bepaal, is 'n Lineweaver-Burk grafiek ($1/V_o$ vs $1/\text{substraat}$) gestip (figuur 6). Die inhibisiekonstante (K_i -waarde) is bepaal deur die oënskynlike K_m -waardes teenoor die peptiedkonsentrasies te stip (kyk figuur 7). Die K_i -waarde is as die x-as afsnit beskou.

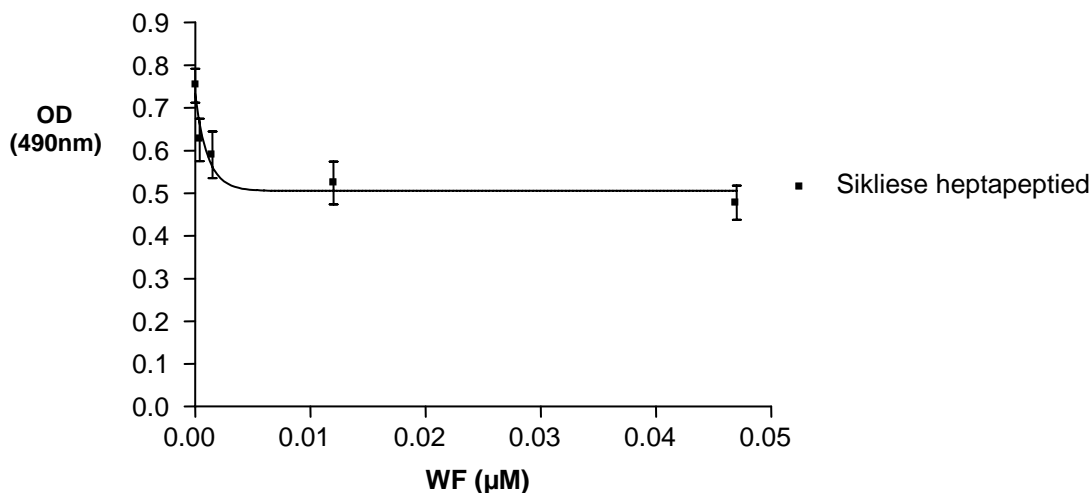
RESULTATE

1. Faagseleksie en DNS volgordebepaling

Die bindings-ELISA het twaalf kolonies geïdentifiseer wat binding aan FVIIa getoon het. Ses van hierdie kolonies was van die dodekapeptiedbiblioteek en ses van die sikliese pentapeptiedbiblioteek afkomstig. 'n Verdunnings-ELISA is uitgevoer op die twaalf kolonies wat FVIIa-bindingsaffiniteit getoon het. 'n Irrelevante faagkolonie is ook getoets vir binding aan FVIIa en is as 'n negatiewe kontrole gebruik. Om die grafiek te vereenvoudig is die bindingsaffiniteit van een kolonie uit elke biblioteek in figuur 1 gestip. Die optiese digtheid het met stygende faagkonsentrasies verhoog, wat daarop dui dat die fage spesifiek aan FVIIa bind. Die faagkolonies van die sikliese heptapeptiedbiblioteek het groter bindingsaffiniteit getoon as dié van die dodekapeptiedbiblioteek ($n=3$). Die faagkolonie wat as 'n negatiewe kontrole gebruik is, het geen binding aan FVIIa getoon nie. 'n Inhibisie-ELISA is gedoen om te bepaal of WF daartoe in staat is om te voorkom dat die kolonies aan FVIIa bind. Die lineêre kolonies het geen inhibisie getoon nie en slegs een vanaf die sikliese biblioteek het matige inhibisie getoon (figuur 2). Laasgenoemde kolonie sowel as een kolonie vanaf die lineêre biblioteek het die PT verleng (figure 3 en 4). Die negatiewe kontrole het geen effek op die PT gehad nie.

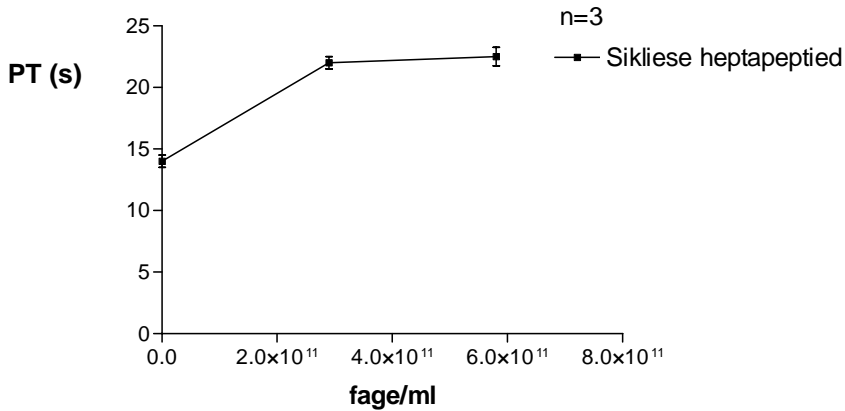


Figuur 1: Verdunnings-ELISA van beide sikliese heptapeptied- en lineêre dodekapeptied-kolonies aan FVIIa. Die OD_{490} vermeerder met stygende faagkonsentrasies. Die sikliese heptapeptied-kolonie bind sterker as die dodekapeptied-kolonie ($n=3$).

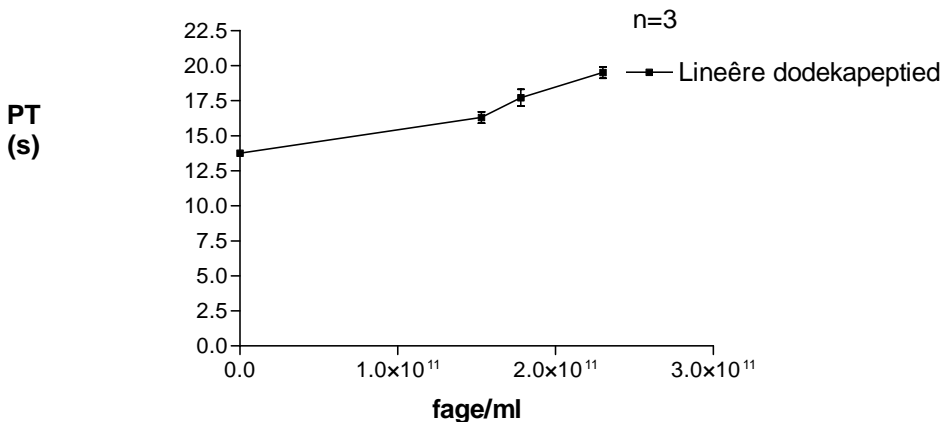


Figuur 2: Inhibisie-ELISA van die sikliese heptapeptied-kolonie by verskillende WF-konsentrasies. WF-konsentrasies van 0 tot 0.05 μM is by FVIIa-bedeekte putjies gevoeg en vir 15 min geïnkubeer. Daar is $5 \cdot 10^{10}$ fage van die sikliese heptapeptied-kolonie by die putjies gevoeg en vir 2 uur geïnkubeer waarna die FVIIa-gebonde fage met 'n anti-faagantiliggam aangetoon is ($n=3$).

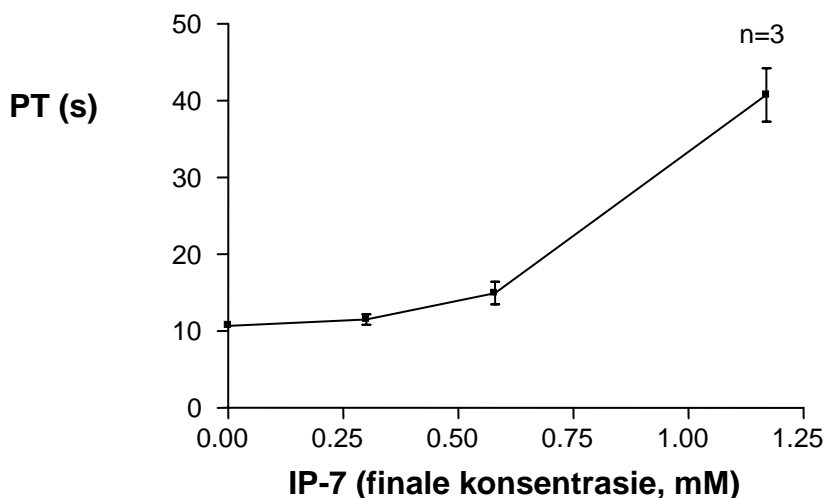
Beide kolonies wat die PT verleng het se DNS-volgorde is bepaal. Dit is interessant om daarop te let dat die volgorde van die kolonie vanuit die sikliese heptameerbiblioteek presies in die middelste deel van die volgorde van die kolonie uit die dodekapeptiedbiblioteek gepas het. Omdat die sikliese kolonie sterker aan FVIIa gebind het, het ons besluit om 'n sikliese peptied met dieselfde volgorde as dié wat op die sikliese kolonie blootgelê is, te sintetiseer. Die volgorde van hierdie peptied is C-AWPHTPD-C. Dit vergelyk nie met die volgorde van 'n reeds gepubliseerde faktor VII inhibeerder PN7051 (C-QY-C) nie.



Figuur 3: PT's met stygende konsentrasies van die sikliese heptapeptied-kolonie. Stygende konsentrasies van hierdie faagkolonie is vir 10 minute met mensplasma geïnkubeer voor toevoeging van die PT-reagens. Die PT is met 8.3 sekondes by die hoogste faagkoloniekonsentrasie ($5.8 \cdot 10^{11}$ fage) verleng



Figuur 4: PT's met stygende konsentrasies van die dodekapeptied-kolonie. Stygende konsentrasies van hierdie faagkolonie is vir 10 minute met menslike plasma geïnkubeer voordat die PT-reagens toegevoeg is. Hierdie faagkolonie verleng die PT op 'n konsentrasie-afhanklike manier. By die hoogste faagkonsentrasie ($2.3 \cdot 10^{11}$ fage) word die PT met 5,4 sekondes verleng ($n=3$).



Figuur 5: Verlenging van die PT in mensplasma. Verskillende peptiedkonsentrasies is by normale gepoelde mensplasma gevoeg en vir 10 minute geïnkubeer voor toevoeging van die PT-reagens. By die hoogste peptiedkonsentrasie, 1.17 mM, is die PT met 30 sekondes verleng. ($n=3$).

2. Toetse uitgevoer op die peptied, IP-7.

IP-7 het die PT op 'n dosisafhanklike manier verleng, en peptiedkonsentrasies van hoër as 0,58 mM was hiervoor nodig (figuur 5). 'n Irrelevante peptied is as negatiewe kontrole gebruik en het geen effek op die PT gehad nie. Die persentasie inhibisie van plaatjieklewing aan endoteelselbedekte dekglasies word in tabel 1 opgesom. Die peptied het plaatjieklewing op 'n dosisafhanklike manier by beide skuiftempo's geïnhipeer. Die inhiherende effek was meer uitgesproke by die arteriële vloeitoestande (1000 s^{-1}) omdat die hoogste peptiedkonsentrasie ($9.35\text{ }\mu\text{M}$) plaatjieklewing aan die dekglasies met 74% onderdruk het. By die lae skuiftempo (200 s^{-1}) was die onderdrukking 54% vir dieselfde peptiedkonsentrasie.

TABEL 1: Persentasie inhibisie van plaatjieklewing aan endoteelselbedekte dekglasies by skuiftempo's van 200 s^{-1} en 1000 s^{-1} ($n=3$)

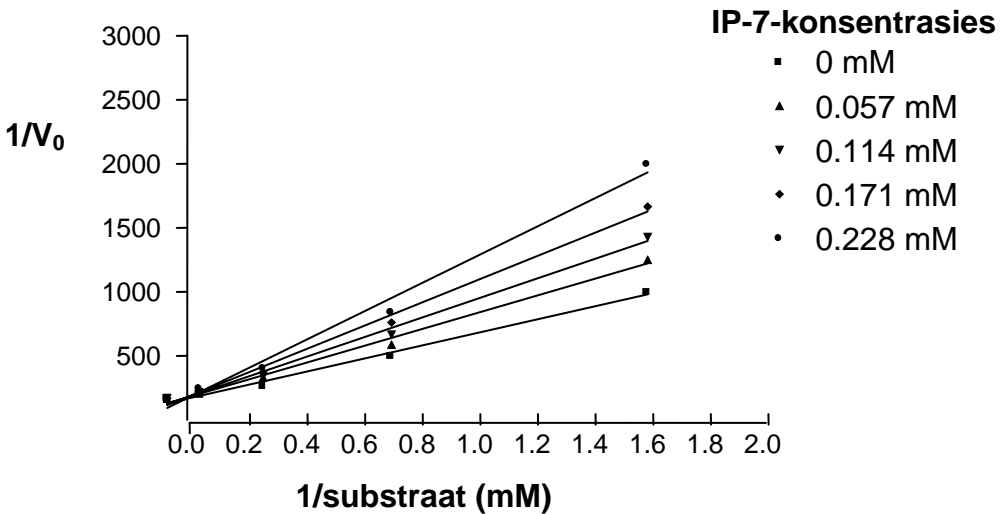
	Persentasie inhibisie by 'n skuiftempo van 200 s^{-1}	Persentasie inhibisie by 'n skuiftempo van 1000 s^{-1}
Kontrole ($0\text{ }\mu\text{M}$ IP-7)	0%	0%
2.34 μM IP-7	19%	22%
4.70 μM IP-7	55%	47%
9.35 μM IP-7	54%	74%

Die peptied het ook die klewing van plaatjies aan WF geïnhipeer. Die persentasie inhibisie van plaatjieklewing aan die dekglasies word in tabel 2 opgesom. Die peptied het 'n meer uitgesproke inhibisie van plaatjieklewing by die hoër skuiftempo veroorsaak. By 'n skuiftempo van 1300 s^{-1} is plaatjieklewing aan die WF-bedekte dekglasies op 'n dosisafhanklike manier onderdruk.

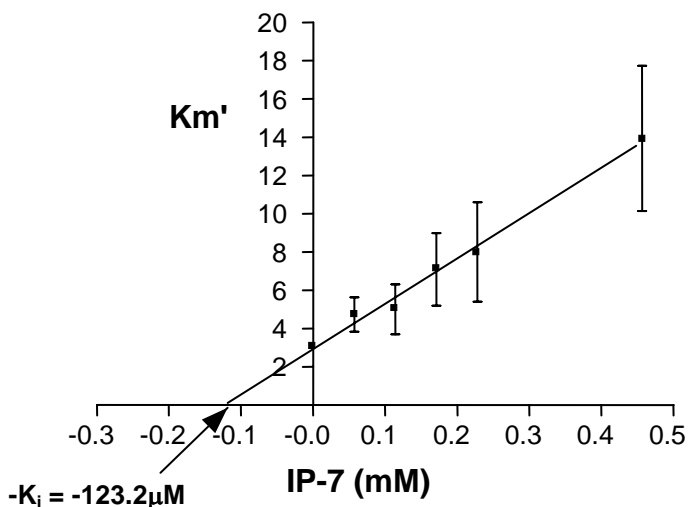
TABEL 2: Persentasie inhibisie van plaatjieklewing aan weefselfaktorbedekte dekglasies by skuiftempo's van 200 s^{-1} , 650 s^{-1} and 1300 s^{-1} ($n=2$)

	Persentasie inhibisie by 'n skuiftempo van 200 s^{-1}	Persentasie inhibisie by 'n skuiftempo van 650 s^{-1}	Persentasie inhibisie by 'n skuiftempo van 1300 s^{-1}
Kontrole (0 μM IP-7)	0%	0%	0%
29.2 μM IP-7	0%	0%	53%
58.5 μM IP-7	33%	59%	87%
117 μM IP-7	Nie bepaal nie	Nie bepaal nie	85%

Met die kinetiese studies het die maksimum omloopsnelheid (V_m -waardes) by die verskillende peptiedkonsentrasies onveranderd gebly terwyl die Michaelis-Menten konstante (K_m -waarde) verhoog het met stygende konsentrasies. Dit kon op mededingende inhibisie dui en om dit te bevestig het ons 'n Lineweaver-Burk grafiek gestip (figuur 6). Hiermee is mededingende inhibisie bevestig omdat die helling van die grafiek toeneem het met stygende peptiedkonsentrasies. Die inhibisiekonstante (K_i -waarde) is bepaal as die x-as afsnit by 123, 2 μM soos aangetoon in figuur 7.



Figuur 6: Lineweaver-Burk-stip wat die effek van mededingende inhibisie aantoon. Die helling van die grafiek neem toe met stygende peptiedkonsentrasies, wat dui op mededingende inhibisie van FVIIa.



Figuur 7: Die K_m -waarde van die reaksies met verskeie IP-7 konsentrasies is gestip teenoor die betrokke peptiedkonsentrasies. Met behulp van hierdie grafiek kon die K_i bepaal word deur die X-afsnit van 'n lineêre regressie te meet. ($n=4$)

BESPREKING

Met hierdie ondersoek het ons die tegniek van faagblootlegging gebruik om peptiede wat FVIIa inhibeer, te selekteer. Daar is op peptiede besluit omdat kleiner molekules minder immunogenies as groter molekules is.⁸ Ons het gepoog om peptiede wat aan die katalitiese domein van FVIIa bind, te selekteer deur die FVIIa-bindende fage in die laaste 2 seleksierondes met 'n muis monoklonale antiliggam wat aan die aktiewe setel van FVIIa bind, te elueer.¹³

Die feit dat die faagkolonies van die sikliese heptapeptiedbiblioteek sterker aan FVIIa as dié van die lineêre een bind, is nie onverwags nie omdat dit bekend is dat sikliese peptiede hefter as lineêre peptiede aan hulle onderskeie ligande bind vanweë verbeterde bindingsentropie.¹⁴ Verder het WF die binding van een van die kolonies van die sikliese peptiedbiblioteek verhoed, wat daarop dui dat hierdie spesifieke sikliese peptied aan dieselfde bindingsetel as WF bind. Die effek is egter beperk omdat WF nie die binding van die fage volledig voorkom het nie (kyk figuur 2). 'n Sikliese peptied met dieselfde aminosuurvolgorde as dié van die sikliese heptapeptiedkolonie, is gesintetiseer. Geen ooreenstemming tussen die volgorde van die gesintetiseerde peptied, IP-7, en dié van WF, FX of WFBI is gevind nie. Daar was twee redes waarom ons besluit het om die sikliese peptied te sintetiseer, naamlik omdat dit sterker aan FVIIa gebind het, en dit bekend is dat sikliese peptiede meer stabiel is as dié met 'n lineêre volgorde en meer bestand is teen proteolise.^{15,16}

IP-7 het plaatjieklewing op 'n dosisafhanklike manier by beide skuiftempo's inhibeer, maar die inhibisie was meer uitgesproke by arteriële vloeitoestande (skuiftempo van 1000 s^{-1}). Die rede hiervoor is dat plaatjies meer by arteriële trombose betrokke is en fibrien by veneuse trombose.¹⁷ Dieselfde resultate is ook tydens die perfusiestudies met WF-bedekte dekglasies gevind. Uit die literatuur blyk dit dat soortgelyke resultate verkry is met 'n ander TF/FVIIa-inhibeerder, PN7051.¹⁸ Lg. peptied het 50% inhibisie met 'n konsentrasie van $500 \mu\text{M}$ met die protrombin tyd getoon in vergelyking met IP-7 wat 58% inhibisie met $58,5 \mu\text{M}$ met die

protrombientyd getoon het. IP-7 blyk dus 'n sterker onderdrukkende effek te hê op trombusvorming as PN7051.¹⁸

Dit is belangrik om daarop te let dat die perfusiestudies met gehepariniseerde bloed uitgevoer is. Dit is bekend dat lae molekulêre gewig heparien (LMWH) nie alle stollingsaktiwiteit blokkeer nie en 'n mate van trombienvorming toelaat sodat fibrienneerlegging op die oppervlakte plaasvind.¹⁷ Fibriennetwerke kan duidelik waargeneem word op die WF-matriks by lae skuiftempo's.

Die inhibisiekonstante (K_i -waarde) is as 123,2 μM bepaal, wat beteken dat IP-7 nie 'n sterk FVIIa-inhibeerder is in vergelyking met van die ander FVIIa-inhibeerders nie. Byvoorbeeld, WFBI inhibeer die aktivering van FXa met 'n K_i van 30 nM, en Kunitz domeinvariante van WFBI inhibeer die FVIIa/WF-kompleks met 'n K_i van 1,9 nM.⁷ 'n Ander peptiedinhibeerder, A-183, wat aan die eksosetel van die proteasedomein van FVIIa bind, inhibeer FX aktivering met 'n K_i van 200 pM.^{6,19}

IP-7 verleng die PT op 'n dosisafhanklike manier. In vergelyking met ander inhibeerders van WF-afhanklike stolling, het 'n peptiedkonsentrasie van 1,17nM die PT drievoudig verleng. PN7051 verleng ook die stolyd op 'n dosisafhanklike manier met 'n IC_{50} van 1.3 mM.¹⁸ Die rede vir die verlenging van die PT kan toegeskryf word aan die binding van die peptied aan FVIIa om die vorming van die FVIIa/WF-kompleks te verhinder en sodoende die aktivering van FX te verhoed. In 'n studie waar die effek van twee verskillende peptiedinhibeerders van die eksosetel van FVIIa met PT gemeet is, het die verlenging van die PT by konsentrasies van groter as 100 nM plaasgevind. IP-7 is dus nie so potent as eksosetel inhibeerders van FVIIa nie⁶, wat waarskynlik aan die kort lengte van die peptied toegeskryf kan word. Dit is in die literatuur aangetoon dat langer peptiede meer aktief is as kort peptiede. 'n 27-aminosuur peptied het byvoorbeeld 'n sewevoudige hoër aktiwiteit as 'n 15-aminosuur peptied getoon.⁶ Die kort sikliese peptied PN7051 (Cys-Gln-Tyr-Cys) het ook 'n baie laer aktiwiteit as langer peptiede getoon.^{6,18}

Verdere studies is nodig om die aktiwiteit van IP-7 te verhoog en sluit onder meer in die koppeling van twee of selfs drie van die peptiede, of die kombinerings van die peptied met ander faktor VIIa of WF inhiberende peptiede.⁶ Aangesien die faagblootleggingstegnologie so 'n kragtige instrument in die ontwikkeling van genesmiddels is, kan dit ook aangewend word in die ontwikkeling van antistolmiddels wat die FVIIa/WF-kompleks inhibeer.⁷

BIBLIOGRAFIE

- Hoffman, M. (2003). Remodelling the blood coagulation cascade. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 16, 17-20.
- Hirsh, J., Dalen, J.E., Deykin, D., Poller, L. (1992). Heparin: mechanism of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. *Chest*, 102, 337S-351S.
- Philips, D.R., Conley, P.B., Sinha, U., Andre, P. (2005). Therapeutic approaches in arterial thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3, 1577-1589.
- Broze, G.J., Warren, L.A., Novotny, W.F., Higuchi, D., Girard, J.J., Miletich, J.P. (1988). The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood*, 71, 335-343.
- Eigenbrot, C. (2002). Structure, function and activation of coagulation factor VII. *Current Protein and Peptide Sciences*, 3, 287-299.
- Lazarus, R.A., Olivero, A.G., Eigenbrot, C., Kirchofer, D. (2004). Inhibitors of tissue factor VIIa for anticoagulant therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 2275-2290.
- Meiring, S.M., Kotzè, H.F., Pretorius, G.H.J., Badenhorst, P.N. (1999). Die toepassing van peptiedblootlegging op fage in trombose en hemostase. *SA Tydskrif vir Wetenskap en Tegnologie*, 18(3), 76-81.
- Markwardt, F. (1990). Hirudin and derivatives as anticoagulant agents. *Thrombosis and Haemostasis*, 66, 141-152.

9. Meiring, S.M., Littauer, D., Härsfalvi, J., van Wyk, V., Badenhurst, P.N., Kotze, H.F. (2002). In vitro effect of a thrombin inhibition peptide selected by phage display technology, *Thrombosis Research*, 107, 365-371.
10. Sakariassen, K.S., Aarts, P.A.M.M., DeGroot, P., Houdijk, W.P.M., Sixma, J.J. (1983). A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix, and purified components, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 102, 522-535.
11. Bonnefoy, A., Härsfalvi, J., Pflieger, G., Fauvel-Lafève, F., Legrand, C. (2001). The subendothelium of the HMEC-1 cell line supports thrombus formation in the absence of Von Willebrand factor and collagen types I, III and VI, *Thrombosis and Haemostasis*, 85, 552-559.
12. Härsfalvi, J., Stassen, J.M., Hoylaerts, M.F., Van Houtte, E., Sawyer, R.T., Vermeylen, J., Deckmyn, H. (1995). Calin from *Hirudo medicinalis*, an inhibitor of Von Willebrand factor binding to collagen under static and flow conditions, *Blood*, 85, 705-711.
13. Clarke, B.J., Ofosu, F.A., Sridhara, S., Bona, R.D., Rickles, .FR., Blajchman, M.A. (1992). The first epidermal growth factor domain of human coagulation factor VII is essential for binding with tissue factor, *FEBS letters*, 298, 206-210.
14. Das, B., Meirovitch, H. (2001). Optimisation of solvation models for predicting the structure of surface loops in proteins, *Proteins*, 43, 303-314.
15. Fabiola, G.F., Bobde, V., Damodharan, L., Pattabhi, V., Durani, S. (2001). Conformational preferences of heterochiral peptides. Crystal structures of heterochiral peptides Boc-(D)Val-(D)Ala-Leu-Ala-Ome and Boc-Val-Ala-Leu-(D)Ala-Ome-enhanced stability of beta-sheet through C-H-O hydrogen bonds, *Journal of Bio molecular Structure Dynamics*, 18, 579-594.
16. Pearce, J. (2001). Going round in circles to avoid proteolysis, *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 282.
17. Sakariassen, K.S., Hanson, S.R., Cadroy, Y. (2001). Methods and models to evaluate shear-dependent and surface reactivity-dependent antithrombotic efficacy, *Thrombosis Research*, 104, 149-174.
18. Örning, L., Fischer, P.M., Hu, C., Agner, E., Engebretsen, M., Husbyn, M., Petersen, L.B., Ørvim, U., Llinas, M., Sakariassen, K.S. (2002). A cyclic pentapeptide derived from the second EGF-like domain of factor VII is an inhibitor of tissue factor dependent coagulation and thrombus formation, *Thrombosis and Haemostasis*, 87, 13-21.
19. Dennis, M.S., Roberge, M., Quan, C., Lazarus, R.A. (2001). Selection and characterization of a new class of peptide exosite inhibitors of coagulation factor VIIa, *Biochemistry*, 40, 9513-9521.

VERKORTE CURRICULA VITAE

Muriel Meiring is medeprofessor in die Departement Hematologie aan die Universiteit van die Vrystaat. Sy behaal haar PhD graad in Hematologie in 1996 waarna sy 'n beurs van die Vlaamse regering ontvang het om haar post-doktorale studie in 1997 in België te doen. In 1998 sluit sy samewerkingsooreenkomste met navorsingsgroepe in België en Hongarye met wie sy nog steeds saamwerk. Sy is outeur van verskeie navorsingsartikels en publiseer in Afrikaans en Engels. Sy het die THUTHUKA-toekenning vir Vroue in Navorsing ontvang en doen ook kontraknavorsing vir verskeie farmaseutiese maatskappye in die ontwikkeling van nuwe antistolmiddels.



Lizel Roets is tans 'n kliniese ouditeur by Farmovs-Parexel. Sy het haar PhD in Hematologie in 2002 behaal vir navorsing in samewerking met American Diagnostica Inc. Met die navorsing het sy gepoog om 'n antistolmiddel te ontwikkel. Huidig voer sy verskeie interne en eksterne ouditte uit om te verseker dat daar aan alle regulasies en riglyne voldoen word. Sy is ook betrokke by sisteemouditte in die verskillende afdelings en help met die aanbieding van interne en eksterne kursusse en interne opleidingsessies.



Philip Badenhorst is hoof van die Departement Hematologie en Selbiologie aan die Universiteit van die Vrystaat en hoofspesialis by die NHL (National Health Laboratory Service). Hy behaal die MB, ChB grade aan die Universiteit van Stellenbosch en MMed en MD aan die Universiteit van die Vrystaat. Hy is ook genoot van die Suid-Afrikaanse Kollege vir Geneeskunde, lid van verskeie nasionale en internasionale professionele en wetenskaplike verenigings, sommige waarvan hy op die bestuur dien. Hy het reeds verskeie eerbewyse ontvang, waaronder die Hendrik Verwoerd Navorsingstoekenning en die Universiteit van die Vrystaat Eeufeesmedalje. Hy is outeur of mede-outeur van vier boeke, 20 hoofstukke in boeke en 90 navorsingsartikels.

