(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110446511 B
(45)授权公告日 2024.04.02

(21)申请号 201880020095.X

(22)申请日 2018.03.12

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110446511 A

(43)申请公布日 2019.11.12

(30)优先权数据
62/469,643 2017.03.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.20

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/021986 2018.03.12

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/165656 EN 2018.09.13

(73)专利权人 北卡罗来纳大学查珀尔希尔分校
地址 美国北卡罗来纳州

(72)发明人 刘健 王章杰 谢柏宏 徐咏梅

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责任公司 11240
专利代理师 张英

(51)Int.Cl.
A61M 1/36(2006.01)
B01D 15/36(2006.01)

(56)对比文件
US 2016122446 A1,2016.05.05
Ronald Copeland等."Using a 3-O-Sulfated Heparin Octasaccharide To Inhibit the Entry of Herpes Simplex Virus Type 1".《Biochemistry》.2008,5774-5783.
Y. Xu等."Chemoenzymatic synthesis of Homogeneous Ultralow Molecular Weight Heparins".《SCIENCE》.2011,498-501.

审查员 封志强

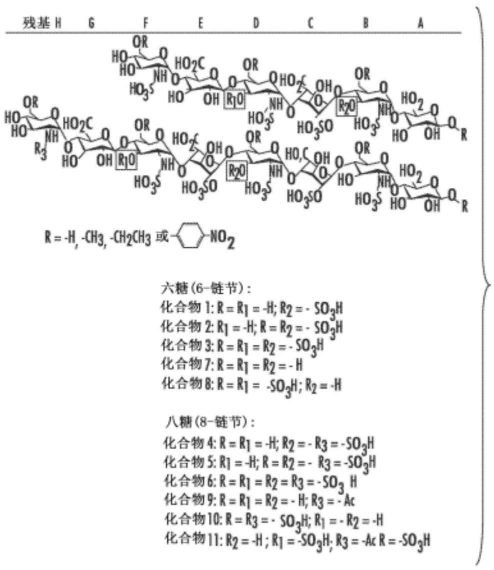
权利要求书3页 说明书25页 附图19页

(54)发明名称

短效的基于肝素的抗凝血剂化合物和方法

(57)摘要

提供了具有短效抗凝血活性的肝素化合物和合成肝素类似物。提供了使用磺基转移酶合成这种肝素化合物的方法,包括化学酶促途径。提供了治疗需要抗凝血活性的受试者的方法。



1.合成肝素类似物在制备在需要其的受试者中用于抗凝血治疗的药物中的用途，其中，所述合成肝素类似物具有抗凝血活性，其中所述合成肝素类似物包含被3-OST-3酶硫酸化的至少一个二糖单元，和至少一个IdoA2S-GlcNS3S或至少一个IdoA2S-GlcNS3S6S二糖单元。

2.根据权利要求1所述的用途，其中所述合成肝素类似物包括IdoA2S-GlcNS3S6S二糖单元，其中所述IdoA2S残基以$^{2}S_{0}$构象存在，所述治疗还包括监测所述受试者的肝素诱导的血小板减少症，并且如果所述受试者患有肝素诱的导血小板减少症，则向所述受试者给予解毒剂以逆转所述合成肝素类似物的抗凝血活性。

3.根据权利要求2所述的用途，其中用于逆转所述合成肝素类似物的抗凝血活性的解毒剂是andexanetα。

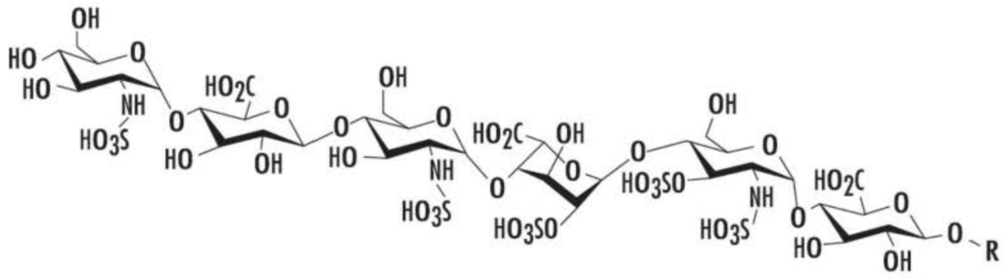
4.根据权利要求1或2所述的用途，其中所述受试者是人受试者。

5.根据权利要求1或2所述的用途，其中所述合成肝素类似物具有比其他肝素化合物快50％～100％的清除率。

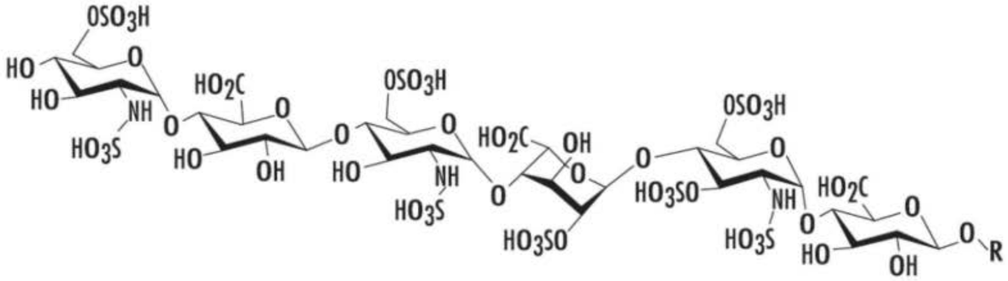
6.根据权利要求1或2所述的用途，其中所述合成肝素类似物在给药后4小时包含小于10％的抗凝血活性。

7.根据权利要求1或2所述的用途，其中所述受试者具有升高的出血风险。

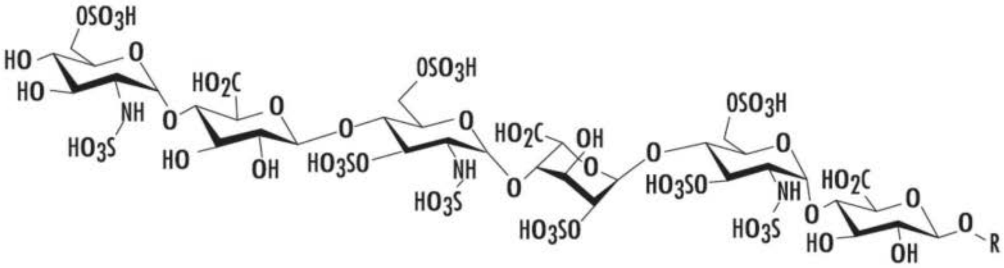
8.根据权利要求1或2所述的用途，其中所述合成肝素类似物包含选自由以下各项组成的组的结构：



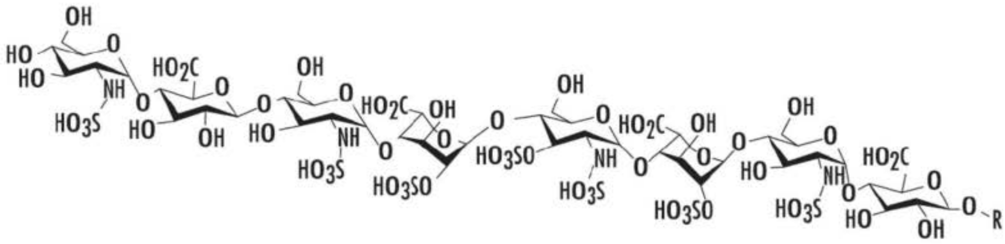
;



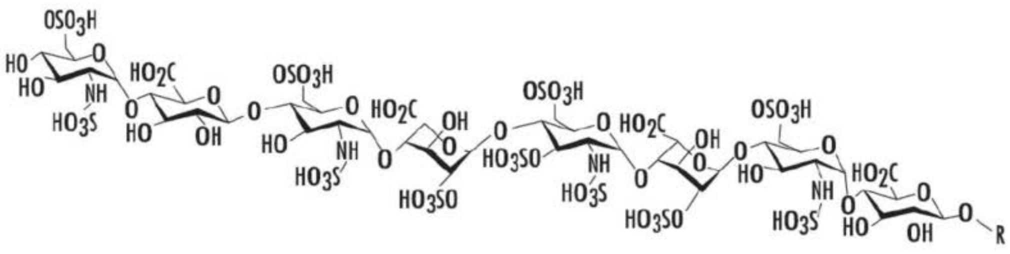
;



;

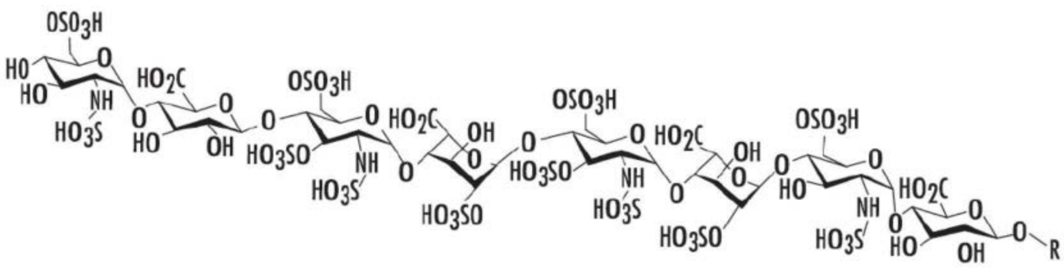


;



;

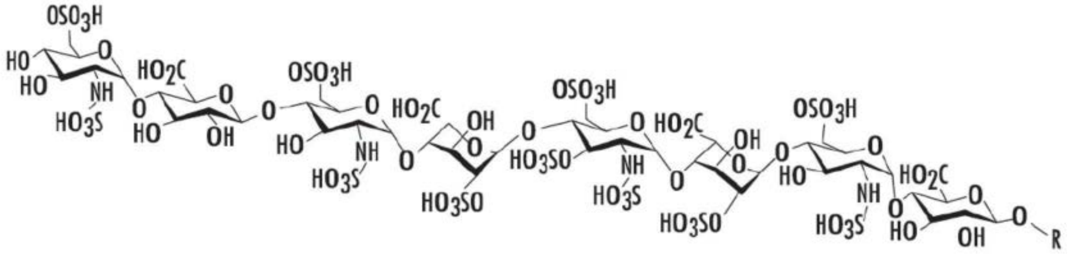
和



其中R选自由-H、烷基、取代烷基、芳基和取代芳基组成的组。

9.根据权利要求8所述的用途，其中所述烷基是$-CH_3$或$-CH_2CH_3$，或所述取代芳基是对硝基苯基。

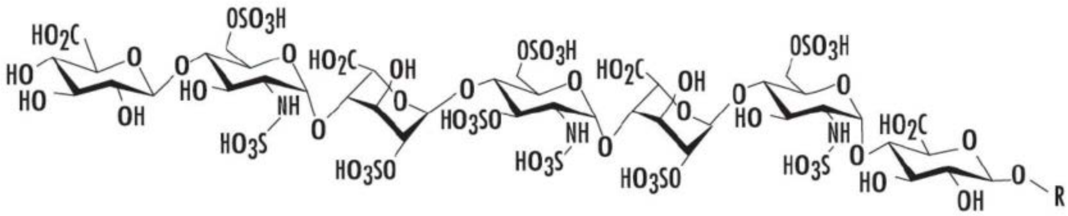
10.根据权利要求1或2所述的用途，其中所述合成肝素类似物由以下结构构成：



其中R选自由-H、烷基、取代烷基、芳基和取代芳基组成的组。

11.根据权利要求10所述的用途，其中所述烷基是$-CH_3$或$-CH_2CH_3$，或所述取代芳基是对硝基苯基。

12.根据权利要求1或2所述的用途，其中所述合成肝素类似物由以下结构构成：



其中R选自由-H、烷基、取代烷基、芳基和取代芳基组成的组。

13.根据权利要求12所述的用途，其中所述烷基是$-CH_3$或$-CH_2CH_3$，或所述取代芳基是对硝基苯基。

短效的基于肝素的抗凝血剂化合物和方法

[0001]　相关申请的引证

[0002]　本申请要求享有2017年3月10日提交的美国临时专利申请序列号62/469,643的权益,该临时专利申请通过引用以其整体结合于本文中。

[0003]　授权声明

[0004]　本发明是在国立卫生研究院(National Institutes of Health)资助的项目号GM102137、HL094463、CA207824和GM103390的政府资助下完成的。政府拥有本发明的某些权利。

技术领域

[0005]　本文公开的主题总体上涉及肝素化合物的合成。更具体而言,本文公开的所述主题涉及具有短效抗凝血剂活性(short acting anticoagulant activity)的肝素化合物和合成肝素类似物的化学酶促合成。

背景技术

[0006]　硫酸乙酰肝素(heparan sulfate)(HS)是细胞表面和细胞外基质的普遍存在的组分。它调节广泛的生理和病理生理功能,包括胚胎发育和血液凝固,并能够促进病毒感染(Esko and Selleck(2002)Annu.Rev.Biochem.71,435-471;Liu and Thorp(2002)Med.Res.Rev.22,1-25)。HS通过与给定过程中涉及的所述特异性蛋白相互作用而发挥其生物学作用(Capila and Lindhardt(2002)Angew.Chem.Int.Ed.41,390-412)。HS是高度带电荷的多糖,其包含1→4-连接的葡糖胺和葡糖醛酸/艾杜糖醛酸单元(含有N-和O-磺基两者)。HS内独特的糖序列能够决定HS与其靶蛋白结合的特异性(Linhardt(2003)J.Med.Chem.46,2551-2564)。肝素(一种特殊形式的HS),是一种常用的抗凝血药物。因此,用于合成肝素化合物和HS的新方法引起了开发具有改进的药理学作用的抗凝血剂和其他HS相关药物的那些人的相当大的兴趣。

[0007]　肝素已成功用作抗凝血药物超过50年(Mackman,2008)。它目前以三种形式上市:未分级(unfractionated)(UF)肝素($MW_{平均}$～14000Da);低分子量肝素($MW_{平均}$～6000Da);和合成ULMW肝素五糖ARIXTRA®(MW 1508.3Da)。UF肝素由于其相对较短的半衰期和对肾功能受损患者的安全性而用于手术和肾透析(Hirsh et al.,2007)。

[0008]　HS寡糖和相关抗凝血化合物的合成仍然是一个挑战。非常需要用于合成新的合成肝素的成本有效方法和方式。

发明内容

[0009]　本发明内容部分列出了本公开主题的若干实施方式,并且在许多情况下列出了这些实施方式的变型(variation)和置换(permutation)。本发明内容部分仅仅是众多不同实施方式的示例。提及给定实施方式的一个或多个代表性的特征同样是示例性的。这样的实施方式通常可以存在或不存在所提及的特征;同样地,这些特征无论是否在本发明内容中

列出,都能够应用于本公开主题的其他实施方式中。为避免过度重复,本发明内容部分未列出或建议此类特征的所有可能组合。

[0010] 在一些实施方式中,本文提供了合成肝素类似物,其包含含有6～8个糖单元、至少一个被3-OST-3酶硫酸化的二糖单元和至少一个IdoA2S-GlcNS3S或IdoA2S-GlcNS3S6S二糖单元的3-O-硫酸化寡糖。在一些实施方式中,此类合成肝素类似物能够具有抗凝血活性。在一些实施方式中,此类合成肝素类似物对抗凝血酶(antithrombin)具有结合亲和力(约5nM～约30nM)。在一些实施方式中,此类合成肝素类似物能够具有约10ngmL^{-1}～约40ngmL^{-1}IC$_{50}$的抗Xa活性。

[0011] 在一些方面中,本文提供的所述合成肝素类似物能够含有至少一个IdoA2S-GlcNS3S6S二糖单元,而并不含GlcA-GlcNS3S6S二糖单元。在一些实施方式中,此类合成肝素类似物能够具有比其他肝素化合物快约50％～约100％的清除率。在一些实施方式中,此类合成肝素类似物不会引起肝素诱导的血小板减少症(HIT)。在一些实施方式中,这种合成肝素类似物在20μg/mL或更少的andexanet-α存在下能够以50％或更高的速率被andexanet-α逆转。

[0012] 在一些实施方式中,本文提供了合成肝素类似物的合成方法,包括提供糖底物,将所述糖底物延伸至所需或预定长度的糖,和使用3-O-磺基转移酶(3-OST)酶的3-OST-3同种型(isoform,同工型)进行至少一次硫酸化反应,由此合成了合成肝素类似物。在一些方面中,所述糖底物包含至少一个IdoA2S-GlcNS3S二糖单元。在一些方面中,所述糖底物包含IdoA2S-GlcNS3S±6S二糖单元,其中所述方法还包括使用6-O-磺基转移酶(6-OST)的6-O-硫酸化步骤,其中通过3-OST-3的3-O-硫酸化发生于6-O-硫酸化步骤之前。在一些方面中,所述糖底物包含GlcA-GlcNS3S6S二糖单元,其中所述方法还包括使用6-O-磺基转移酶(6-OST)的6-O-硫酸化步骤,其中通过3-OST-1的3-O-硫酸化发生于6-O-硫酸化步骤之前。

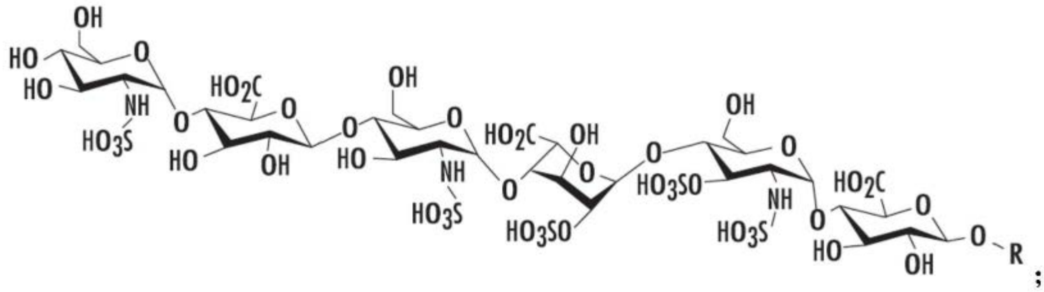
[0013] 在一些方面中,所述延伸步骤包括使用葡糖基转移酶。在一些实施方式中,所述葡糖基转移酶选自由大肠杆菌K5的N-乙酰基葡糖胺基转移酶(KfiA)和/或来自多杀巴斯德氏菌(Pasteurella multocida)的肝素合酶(heparosan synthase)-2(pmHS2)组成的所述组中。在一些实施方式中,所述延伸步骤包括使用一种或多种选自由以下组成的所述组中的单糖:葡糖醛酸(GlcUA),N-乙酰化葡糖胺(GlcNAc)和N-三氟乙酰基葡糖胺(GlcNTFA)。在一些方面中,所述合成肝素类似物的合成方法具有大于约20％～约50％的产率。

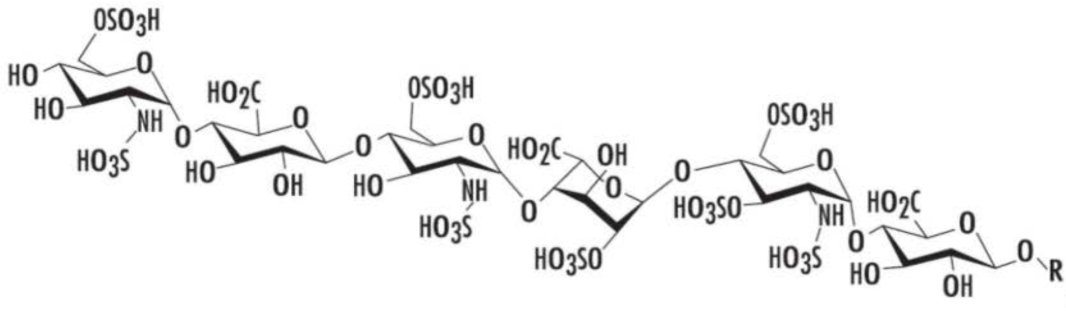
[0014] 本文还提供了治疗需要抗凝治疗的受试者的方法,所述方法包括提供需要抗凝治疗的受试者,向所述受试者给予具有抗凝血活性的合成肝素类似物,其中所述合成肝素类似物包含至少一个通过3-OST-3酶硫酸化的二糖单元和至少一个IdoA2S-GlcNS3S或IdoA2S-GlcNS3S6S二糖单元。在一些实施方式中,此类方法还包括监测所述受试者的肝素诱导血小板减少症,并且如果所述受试者患有肝素诱导血小板减少症,则向所述受试者给予解毒剂(antidote)以逆转所述合成肝素类似物的抗凝血活性。在一些实施方式中,所述逆转合成肝素类似物的抗凝血活性的解毒剂是andexanet-α。在一些实施方式中,所述受试者是人受试者。

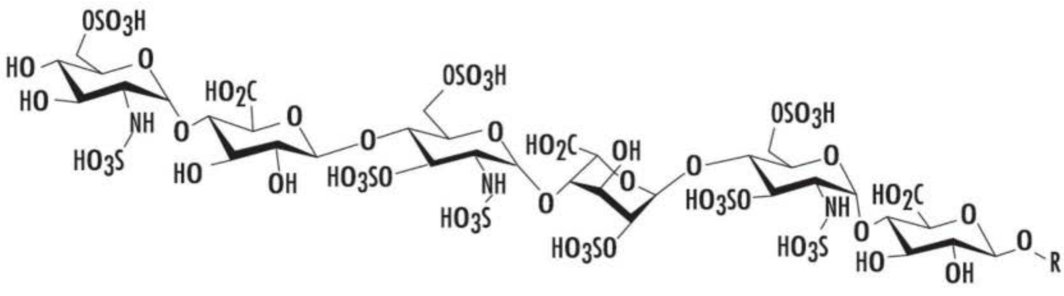
[0015] 在治疗受试者的这种方法中,所述合成肝素类似物能够具有比其他肝素化合物快约50％～约100％的清除率。所述合成肝素类似物在给药后4小时能够包含小于约10％的抗凝血活性。在这些方法中,所述受试者能够具有升高的出血风险。

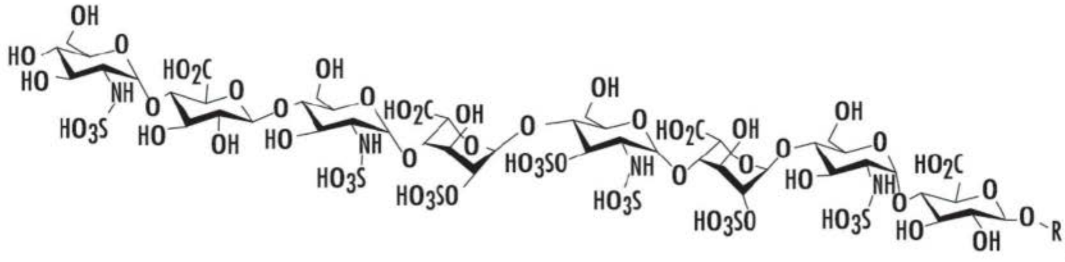
[0016] 本文提供了包含本文公开的合成肝素化合物的药物组合物。

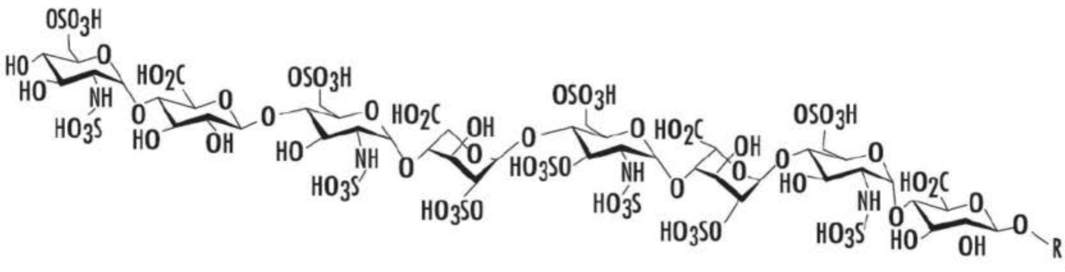
[0017] 本文公开的所述合成肝素类似物,包括制备和/或使用它们的方法,能够包括一种结构,其包括,例如:

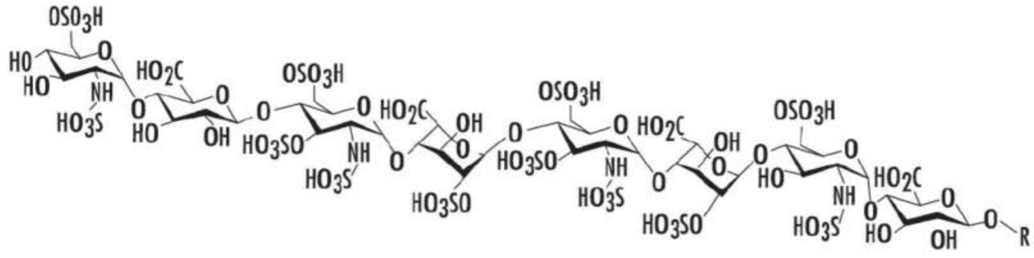
[0018] 

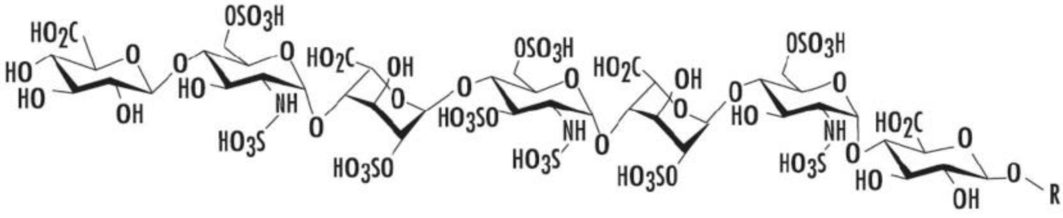
；

；

[0019] ；

；

；和

[0020] ，

[0021] 其中R选自由-H、烷基(例如,但不限于,$-CH_3$或$-CH_2CH_3$)、取代烷基、芳基和取代芳基(例如,但不限于,对硝基苯基)组成的所述组中。

[0022] 因此,本发明公开的所述主题的目的是提供短效的基于肝素的抗凝血剂化合物(short-acting heparin-based anticoagulant compound)和方法,包括新形式的合成肝素。

[0023] 该目的和其他目的通过本发明公开的所述主题而全部或部分实现。此外,在以下描述、附图和实施方式的研究之后,对于本领域技术人员而言,具有以上陈述的本公开的所述主题的目的、本公开的主题的其他目的和优点将变得显而易见。

附图说明

[0024] 通过参考以下附图能够更好地理解本公开的主题。所述附图中的组件不一定按比例绘制,而是将重点放在(通常示意性地)说明本公开的主题的原理上。在所述附图中,相同的附图标记在不同视图中表示相应的部件。通过参考所述附图的图示中阐述的实施方式,能够获得对本公开的主题的进一步理解。尽管所示实施方式仅是用于执行本公开的主题的系统的举例说明,但通常通过参照附图和以下描述可以更容易理解本公开主题的组织和操作方法(通常与其进一步的目标和优点一起)。所述附图并非旨在限制本公开主题的范围(该主题在所附的或随后修改的权利要求中进行具体阐述),而仅仅是为了阐明和举例说明本公开的主题。

[0025] 为了更完整地理解本公开的主题,现在参考以下附图,其中:

[0026] 图1A～图1C图示说明了本文公开和测试的六糖和八糖的合成,包括图1A、图1B和图1C,图1A是本文公开的六糖和八糖的示意图,图1B是合成本文公开的六糖和八糖的示例性方法的示意图,图1C图示说明了本文公开的六糖和八糖的IdoA2S残基的吡喃糖环的化学结构。

[0027] 图2A是高分辨阴离子交换HPLC的结果的图示,而图2B显示了对化合物6进行的证明本文公开的寡糖的纯度和结构分析的电喷雾电离质谱(electrospray ionization mass spectrometry)(ESI-MS)的结果;

[0028] 图3A～图3D是图示说明GlcNS3S6S-IdoA2S-二糖单元的存在对抗凝血活性的影响的结果的图示汇总。

[0029] 图4A是所述AT-结合位点的化学结构的示意图,而图4B图示描述了复合物中AT的分子动力学(MD)模拟的结果;

[0030] 图5A～图5C图示说明了使用不同尺寸的结构均匀性寡糖对于3-OST-1和3-OST-3的底物要求,其中图5A和图5B是显示对于3-OST-1和3-OST-3的底物要求的柱状图(bar graphs),其中图5C图示说明了不同尺寸的寡糖的化学结构;

[0031] 图6A～图6F分别是化合物1、2、3、4、5和6的化学结构的示意图;

[0032] 图7A是证实本文公开的肝素化合物在C57BL/6J小鼠模型中具有比磺达肝素(fondaparinux)更快的清除率的数据的图示汇总。图7B是证实本文公开的肝素化合物的抗-Fxa活性能够被andexanet-α(AndexXa®,Portola Pharmaceuticals,South San Francisco,California,美国)逆转的数据的图示汇总;和

[0033] 图8A～图8C描绘了本文公开的所述7-链节(7-mer)HS化合物的分析结果,图8A是显示所述7-链节具有抗-Xa活性的数据的图示汇总,图8B示意性地将所述7-链节的化学结构与本文公开的6-链节和8-链节进行比较。图8C图示说明了合成所述7-链节的合成途径。

具体实施方式

[0034] 现在将在下文中更全面地描述本公开的主题,其中描述了本公开主题的一些而非全部实施方式。实际上,所公开的主题可以以许多不同的形式实施,并且不应该被解释为限于本文中阐述的实施方式;相反,这些实施方式的提供是为了使本公开满足适用的法律要求。

[0035] 葡糖胺的3-OH位置的硫酸化是形成硫酸乙酰肝素的结构域使之能够实现其生物学功能的至少一种重要修饰。人类基因组中的7种3-O-磺基转移酶同种型涉及3-O-硫酸化硫酸乙酰肝素的生物合成。作为硫酸乙酰肝素中存在的罕见修饰,3-O-硫酸化寡糖的可用性(availability)是非常有限的。本文公开了一种合成六种3-O-硫酸化寡糖的新型化学酶促合成方法,包括三种六糖和三种八糖。所述合成通过重新排列所述酶修饰序列以适应3-O-磺基转移酶3的底物特异性而实现。3-O-硫酸化对2-O-硫酸化艾杜糖醛酸的吡喃糖环构象的影响使用NMR进行了研究,并研究了3-O-硫酸化对环构象与抗凝血剂活性之间的相关性的影响。由此发现了一种与抗凝血酶相互作用并表现出抗因子Xa活性的新型八糖。有趣的是,在大鼠模型中,所述八糖比磺达肝素这种批准的五糖药物表现出更快的清除速率,从而使这种八糖成为一种能够降低出血风险的潜在短效抗凝药物候选药。所公开的3-O-硫酸化寡糖还提供新的基于硫酸乙酰肝素的治疗。

[0036] 硫酸乙酰肝素(HS)是包含与葡糖胺(GlcN)残基连接的葡糖醛酸(GlcA)或艾杜糖醛酸(IdoA)残基的二糖重复单元的多糖(其中每个都能够通过硫酸化进行修饰)。HS表现出重要的生理和病理功能,包括调节胚胎发育、炎症反应、凝血和病毒/细菌感染[1-3]。最值得注意的是,肝素(一种高度硫酸化形式的HS),是一种广泛用于临床治疗血栓性疾病患者的抗凝血药物[4]。

[0037] HS和肝素的功能选择性能够至少部分由所述硫酸化类型和GlcA和IdoA残基的位置决定[5]。在IdoA(较小程度GlcA)的所述2-OH和GlcN残基的所述N-、3-OH和6-OH位置上发现了硫酸化。此外,所述IdoA和IdoA2S残基的构象采用椅式($^1C4$)和扭船式($^2S_0$)构象[6]。GlcA、GlcA2S和GlcN残基的构象存在于所述椅式($^4C1$)构象中[7,8]。IdoA2S残基的构象灵活性允许与抗凝血酶结合从而表现出抗凝血活性[9]以及允许与成纤维细胞生长因子结合从而调节细胞生长[10]。

[0038] HS寡糖的合成仍然是一个挑战。许多寡糖能够通过纯有机合成方法合成,但仍然很难合成大于具有复杂硫酸化模式的六糖的寡糖。作为替代方法,存在使用涉及葡糖基转移酶、C5-差向异构酶和磺基转移酶的HS生物合成酶合成HS寡糖的化学酶促法[16,17]。该方法能够为多种寡糖提供高效合成;然而,由于缺乏对HS生物合成酶的底物特异性的认识,某些寡糖序列的合成尚无可能。

[0039] 所述3-O-硫酸化在HS中很少发生,但认为这种硫酸化类型与其生物学功能密切相关。3-O-硫酸化对于抗凝血活性可能很重要[19],促进单纯疱疹病毒进入宿主细胞以建立感染[20],调节神经元的轴突导向和生长[18]并控制祖细胞扩增以进行唾液腺发育[3]。确切地说,3-O-硫酸化葡糖胺(GlcNS3S±6S)残基如何在促进HS的生物活性中发挥作用目前尚不清楚。GlcNS3S±6S残基显示被其他单糖残基包围,形成独特的硫酸化糖序列结构域,使HS能够发挥其生物学作用。例如,存在于五糖结构域中的GlcNS3S±6S残基使HS能够与抗凝血酶(AT)结合。携带GlcNS3S±6S残基的八糖与单纯疱疹病毒糖蛋白D相互作用。人类基因组中存在7

种3-OST同种型,可以潜在地用于制备不同的3-O-硫酸化寡糖[26]。

[0040] 本文公开了使用化学酶促方法制备3-O-硫酸化寡糖库的方案。本文证实,为了合成包含所述-IdoA2S-GlcNS3S-或-IdoA2S-GlcNS3S6S-二糖单元的寡糖,所述3-OST-3修饰必须在所述6-O-硫酸化步骤之前,而3-OST-1修饰仅能够在6-O-硫酸化后发生,以便产生所述-GlcA-GlcNS3S6S-二糖单元。来自所述四糖底物的3-OST-3与6-O-磺基之间没有相互作用,这与3-OST-3的寡糖底物并不需要6-O-硫酸化的结论是一致的。相对而言,在来自所述七糖底物的3-OST-1和6-O-磺基之间却观察到相互作用,这表明需要6-O-硫酸化以结合至3-OST-1。正如本文第一次公开的,3-OST-1和3-OST-3之间的特殊且独特的底物要求揭示了由不同同种型的3-OST修饰的3-O-硫酸化HS通过不同途径进行生物合成。

[0041] 人们普遍接受,所述3-OST-1酶负责合成抗凝血剂HS,而所述3-OST-3酶则不是如此[34,35]。迄今分离的所述AT-结合序列均包含所述-GlcA-GlcNS3S6S-二糖重复单元,其是3-OST-1酶修饰的产物[33,39]。基于由所公开的方法开发的寡糖并且是3-OST-3酶修饰产物会与AT结合并表现出抗凝血活性的发现,本发明公开内容对这一长期存在的观点提出质疑。这些发现表明,只要所述HS包含与本文公开的化合物的结构域类似的结构域,包括,例如,但不限于化合物5,则3-OST-3能够合成抗凝血剂HS。

[0042] 本文还公开了的发现是一些开发的HS化合物或寡糖具有出乎意料的快速清除率。这些化合物的快速清除提供了一种具有降低出血风险的潜在新型短效抗凝血药物候选药物。短效抗凝血药物(其能够在出现大出血效应之前迅速从所述循环中清除),对于那些与正常或健康的患者/受试者相比具有高出血风险或出血风险升高的患者,将是特别有益的。虽然未分级肝素(unfractionated heparin)是一种半衰期短的抗凝剂,但令人担忧的是该药物会引起肝素诱导血小板减少症(HIT),这是一种危及生命的副作用[42]。据已发现,小于12-链节的短寡糖[43]不会与血小板因子4结合,因此不表现出HIT的风险。作为六糖和八糖,本文公开的所述化合物(包括,例如,化合物5),预期会具有非常低的HIT风险。

[0043] 在一些实施方式中,正如本文所公开的HS化合物或合成肝素类似物能够包含含有六至八个二糖单元的3-O-硫酸化寡糖,至少一个二糖单元被3-OST-3酶硫酸化,和至少一个IdoA2S-GlcNS3S或IdoA2S-GlcNS3S6S二糖单元。正如本文工作实施例所示,这种合成肝素类似物具有抗凝血活性,包括对抗凝血酶的结合亲和力(约5nM～约30nM)和抗Xa活性(约$10ngmL^{-1}$～约$40ngmL^{-1}IC_{50}$)。这种合成肝素类似物的结构或构成以化合物1～11,特别是1-6为例,包括于图6A～图6F中。

[0044] 正如本文的进一步讨论,在一些实施方式中,所述合成肝素类似物,特别是与肝素和类肝素化合物相比,能够具有出乎意料的快速清除率。例如,在大鼠或小鼠模型中化合物5的清除率比磺达肝素的清除速率快至少约50％,75％或100％,或约50％～约100％,约60％～约90％,约70％～约80％,约50％～约75％,或约75％～约100％。这种快速清除能够使这些化合物适合作为短效抗凝血化合物,其特别适用于具有较高出血风险的应用和/或受试者。这种化合物还证实不会引起肝素诱导血小板减少症(HIT)。

[0045] 合成肝素类似物的合成方法如图所示(参见,例如,图1A、图1B和图8C)并在本文中进行进一步讨论,但在某些方面中能够包括:提供糖底物,将所述糖底物延伸至所需或预定长度的糖类,使用3-O-磺基转移酶(3-OST)酶的3-OST-3同种型进行至少一次硫酸化反应,由此合成了合成肝素类似物。所述糖底物可以包含至少一个IdoA2S-GlcNS3S二糖单元。

[0046]　所公开的合成肝素类似物的合成方法能够提供令人惊讶的高产率的肝素化合物。作为实例而非限制,所公开的合成肝素类似物的合成方法能够具有大于约20%,大于约30%,大于约40%,大于约50%,约20%～约50%,约30%～约50%,或约40%～约50%的产率。

[0047]　在所述糖底物包含IdoA2S-GlcNS3S±6S二糖单元的情况下,这种方法能够进一步包括使用6-O-磺基转移酶(6-OST)的6-O-硫酸化步骤,其中通过3-OST-3的3-O-硫酸化发生于所述6-O-硫酸化步骤之前。相对而言,在所述糖底物包含GlcA-GlcNS3S6S二糖单元的情况下,这种方法能够进一步包括使用6-O-磺基转移酶(6-OST)的6-O-硫酸化步骤,其中通过3-OST-1的3-O-硫酸化发生于6-O-硫酸化步骤之前。

[0048]　本公开的肝素化合物和合成肝素类似物的开发还提供了使用其治疗受试者的治疗和方法。例如,在一些实施方式中,提供了治疗需要抗凝治疗的受试者的方法。此类方法能够包括:提供需要抗凝血剂治疗的受试者和向所述受试者给予具有抗凝血活性的合成肝素类似物,其中所述合成肝素类似物包含至少一个被3-OST-3酶硫酸化的二糖单元和至少一个IdoA2S-GlcNS3S或IdoA2S-GlcNS3S6S二糖单元。在需要时,还能够监测所述受试者的肝素诱导血小板减少症,并且如果进行检测,则如果所述受试者患有肝素诱导血小板减少症,则能够向所述受试者给予解毒剂以逆转所述合成肝素类似物的抗凝血活性。这种抗凝血活性的逆转能够通过,例如,在20μg/mL或更低的andexanet-α存在下以50%或更高的比率通过andexanet-α(AndexXa®,Portola Pharmaceuticals,South San Francisco,California,美国)实现。

[0049]　因此,根据本公开主题的一些实施方式,提供了一种治疗需要抗凝治疗的受试者的方法。在一些实施方式中,所述方法包括:提供需要抗凝治疗的受试者;向所述受试者给予具有抗凝血活性的合成肝素类似物,其中所述合成肝素类似物包含至少一个被3-OST-3酶硫酸化的二糖单元和至少一个IdoA2S-GlcNS3S或IdoA2S-GlcNS3S6S二糖单元。

[0050]　在一些实施方式中,本公开的主题提供了具有抗凝血活性的合成肝素类似物,其中所述合成肝素类似物包含至少一个被3-OST-3酶硫酸化的二糖单元和至少一个IdoA2S-GlcNS3S或IdoA2S-GlcNS3S6S二糖单元,用于治疗和/或预防其中抗凝血活性是有利的疾病或病症。作为示例而非限制,此类疾病或病症能够包括患有深静脉血栓形成(deep vein thrombosis)高风险的患者和个体,包括癌症患者。

[0051]　在还有的另一个实施方式中,本公开提供了具有抗凝血活性的合成肝素类似物的用途,其中所述合成肝素类似物包含至少一个被3-OST-3酶硫酸化的二糖单元和至少一个IdoA2S-GlcNS3S或IdoA2S-GlcNS3S6S二糖单元,用于制备用于治疗和/或预防其中抗凝血活性是有利的疾病或病症的药物组合物。

[0052]　本文公开了示例性合成肝素类似物或HS化合物,包括,例如,图1A和图6A～图6F中所示。在所示的结构中,“R”能够包括质子(-H)、$-CH_3$、$-CH_2CH_3$或类似于对硝基苯基的其他取代基团。这些基团也能够包括和/或称为烷基或低级烷基。在一些实施方式中,类似于对硝基苯基的其他取代基团能够包括芳基或取代芳基。可替代地或另外地,在一些实施方式中,“R”能够包括可检测标记或可检测部分。

[0053]　定义

[0054]　本文中使用的所述术语仅用于描述具体实施方式的目的,而非旨在限制本公开的

主题。

[0055] 尽管据信以下术语对于本领域普通技术人员是充分理解的，但阐述以下定义会有助于对本公开主题的诠释。

[0056] 除非下文另外定义，否则本文使用的所有技术和科学术语旨在具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。对本文采用的技术的引用旨在表示本领域通常理解的技术，包括对那些技术的变化或对本领域技术人员显而易见的等效技术的替代。尽管所述以下术语据信被本领域普通技术人员充分理解，但阐述以下定义则有助于阐释本公开的主题。

[0057] 在描述本公开的主题时，应该理解的是，许多技术和步骤被公开。这些中的每一个都具有各自益处，并且每个也能够与其他公开的技术中的一个或多个，或在一些情况下全部技术进行结合而使用。

[0058] 因此，为了清楚起见，本说明书将避免以不必要的方式重复所述各个步骤的每种可能组合。然而，应该在以下理解(即，这些组合完全落在本发明和所述权利要求的范围内)的情况下，阅读所述说明书和权利要求书。

[0059] 根据长期存在的专利法惯例，在本申请中(包括所述权利要求书中)使用时，所述术语“一种”、“一个”和“该”是指“一个或多个”。因此，例如，提及“一个细胞”包括多个这样的细胞，等等。

[0060] 除非另有说明，否则在所述说明书和权利要求书中使用的表示成分的量、反应条件等的所有数字应该理解为在所有情况下均由所述术语“约”修饰。因此，除非有相反的指示，否则本说明书和所附权利要求书中列出的数值参数是能够根据寻求通过本公开的主题获得的所需性质而变化的近似值。

[0061] 正如本文所用，所述术语“约”，当涉及组合物的值或量时，剂量、序列一致性(sequence identity)(例如，当比较两个或更多个核苷酸或氨基酸序列时)、质量、重量、温度、时间、体积、浓度、百分比等都意味着在一些实施方式中涵盖所述指定量的±20％的变化，在一些实施方式中涵盖所述指定量的±10％的变化，在一些实施方式中涵盖所述指定量的±5％的变化，在一些实施方式中涵盖所述指定量的±1％的变化，在一些实施方式中涵盖所述指定量的±0.5％的变化，和在一些实施方式中涵盖所述指定量的±0.1％的变化，因为这样的变化适合于实施所公开的方法或使用所公开的组合物。

[0062] 与“包括”、“含有”或“特征在于”同义的所述术语“包含”是包含性的或开放式的，且并不排除另外的未列举元素或方法步骤。“包含”是权利要求语言中使用的技术术语，其是指所指定的要素是必要的，而其他要素能够被添加并且仍然形成所述权利要求范围内的结构体(construct)。

[0063] 正如本文所用，所述短语“由...组成”不包括所述权利要求中未指定的任何要素、步骤或成分。当所述短语“由...组成”出现于权利要求主体的一个条款中而不是紧接于前序部分之后时，它仅限制该条款中规定的要素；其他要素作为整体则不排除于所述权利要求之外。

[0064] 正如本文所用，所述短语“基本上由......组成”会将权利要求的范围限制于所指定的材料或步骤，加上不会实质影响所要求保护的主题的基本的和新颖的特性的那些材料或步骤。

[0065] 关于所述术语“包含”、“由......组成”和“基本上由......组成”(其中本文使用了这三个术语之一),本公开和要求保护的主题能够包括所述其他两个术语中的任一个的使用。

[0066] 正如本文所用,所述术语“和/或”当在实体列表的上下文中使用时,是指单独地或组合地存在的实体(entity)。因此,例如,所述短语“A、B、C和/或D”包括单独的A、B、C和D,但也包括A、B、C和D的任何和所有组合和子组合。

[0067] 正如本文所用,所述术语“烷基”是指C_{1-20}(包括C_1和C_{20})线性(即“直链”)、支链或环状的饱和或至少部分且在一些情况下完全不饱和(即,烯基和炔基)的烃链,包括例如,甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、辛基、乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基、辛烯基、丁二烯基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基、庚炔基和丙二烯基(allenyl)。“支链的”是指其中低级烷基如甲基、乙基或丙基与直链烷基链连接的烷基。“低级烷基”是指具有1～约8个碳原子,例如,1、2、3、4、5、6、7或8个碳原子的烷基(即,C_{1-8}烷基)。“高级烷基”是指具有约10～约20个碳原子,例如,10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个碳原子的烷基。在某些实施方式中,“烷基”具体而言是指C_{1-8}直链烷基。在其他实施方式中,“烷基”具体而言是指C_{1-8}支链烷基。

[0068] 烷基能够可选地被一个或多个烷基取代基取代(“取代烷基”),所述烷基取代基可以相同或不同。所述术语“烷基取代基”包括,但不限于,烷基、取代烷基、卤素、芳基氨基、酰基、羟基、芳氧基、烷氧基、烷硫基、芳硫基、芳烷氧基、芳烷硫基、羧基、烷氧基羰基、氧代和环烷基。沿着所述烷基链能够可选地插入一个或多个氧、硫或取代或未取代的氮原子,其中所述氮取代基是氢、低级烷基(在本文中也称为“烷基氨基烷基”)或芳基。

[0069] 因此,正如本文所用,所述术语“取代烷基”包括如本文所定义的烷基,其中所述烷基的一个或多个原子或官能团被另一个原子或官能团取代,包括例如,烷基、取代烷基、卤素、芳基、取代芳基、烷氧基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、硫酸酯和巯基。

[0070] 本文使用的所述术语“芳基”是指能够是单个芳环或多个芳环(稠合在一起、共价连接或连接到共同基团如,但不限于,亚甲基或亚乙基部分)的芳族取代基。所述共同连接基团也能够是羰基,如在二苯甲酮中,或氧,如在二苯醚中,或氮,如在二苯胺中。所述术语“芳基”具体而言包括杂环芳族化合物。所述芳环能够包括苯基、萘基、联苯基、二苯基醚、二苯胺和二苯甲酮等。在具体实施方式中,所述术语“芳基”是指包含约5～约10个碳原子,例如,5、6、7、8、9或10个碳原子,并且包括5-和6-元烃和杂环芳族环的环状芳族化合物。

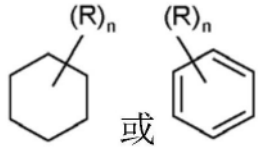
[0071] 所述芳基能够可选地被一个或多个可以相同或不同的芳基取代基取代(“取代芳基”),其中“芳基取代基”包括烷基、取代烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、羟基、烷氧基、芳氧基、芳烷氧基、羧基、酰基、卤素、硝基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、芳烷氧基羰基、酰氧基、酰基氨基、芳酰基氨基、氨基甲酰基(carbamoyl)、烷基氨基甲酰基、二烷基氨基甲酰基、芳硫基、烷硫基、亚烷基和-NR'R”,其中R'和R”每个能够独立地为氢、烷基、取代烷基、芳基、取代芳基和芳烷基。

[0072] 因此,正如本文所用,所述术语“取代芳基”包括如本文所定义的芳基,其中所述芳基的一个或多个原子或官能团被另一个原子或官能团(包括例如,烷基、取代烷基、卤素、芳基、取代芳基、烷氧基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、硫酸酯和巯基)取代。

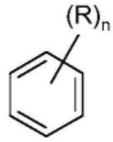
[0073] 芳基的具体实例包括,但不限于,环戊二烯基、苯基、呋喃、噻吩、吡咯、吡喃、吡啶、

咪唑、苯并咪唑、异噻唑、异噁唑、吡唑、吡嗪、三嗪、嘧啶、喹啉、异喹啉、吲哚、咔唑等等。

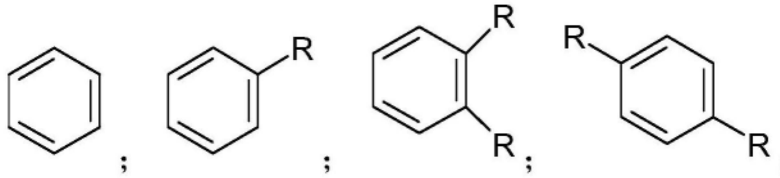
[0074] 正如本文所用的,通常由以下式表示的结构如:

[0075] 

[0076] 是指环结构,例如,但不限于,包含取代基R基团的3-碳、4-碳、5-碳、6-碳等脂族和/或芳族环状化合物,其中所述R基团能够存在或不存在,并且当存在时,一个或多个R基团每个能够在所述环结构的一个或多个可用碳原子上被取代。所述R基团的存在或不存在以及R基团的数量由所述整数n的值确定。每个R基团(如果不止一个)在所述环结构的可用碳上而不是在另一个R基团上被取代。例如,所述结构:

[0077] 

[0078] 其中n是0～2的整数,包括化合物基团,包括但不限于:

[0079]  等。

[0080] “环状”和“环烷基”是指约3～约10个碳原子,例如,3、4、5、6、7、8、9或10个碳原子的非芳族单环或多环环体系。所述环烷基能够可选地部分不饱和。所述环烷基也能够可选地被本文所定义的烷基取代基、氧基和/或亚烷基取代。沿着所述环烷基链能够可选地插入一个或多个氧、硫或取代或未取代的氮原子,其中所述氮的取代基是氢、烷基、取代烷基、芳基或取代芳基,从而提供杂环基。代表性的单环环烷基环包括环戊基、环已基和环庚基。多环环烷基环包括金刚烷基、八氢萘基、十氢化萘(decalin)、樟脑、莰烷和正金刚烷基(noradamantyl)。

[0081] 所述术语“杂环”是指约3～约14个原子的非芳族或芳族单环或多环环体系,其中至少一个所述原子是杂原子(例如,氧,氮或硫)。所述术语“N-杂环”是指其中至少一个杂原子是氮原子的杂环。N-杂环的实例包括,但不限于,氮杂环丁烷(azetidine)、吡咯烷(pyrrolidine)、吡咯、吡咯啉、哌啶、吡啶、哌嗪、吡嗪、嘧啶、哒嗪、吗啉和噻嗪。

[0082] “芳烷基”是指芳基-烷基-基团,其中芳基和烷基如前所述,并包括取代芳基和取代烷基。示例性的芳烷基包括苄基、苯乙基和萘甲基。

[0083] 正如本文所用,所述术语“酰基”是指有机羧酸基团,其中所述羧基的-OH已经被另一个取代基(即,如RC(＝O)-所示,其中R是本文定义的烷基、取代烷基、芳烷基、芳基或取代芳基)取代。因此,所述术语“酰基”具体而言包括芳酰基,如乙酰基呋喃和苯酰基。酰基的具体实例包括乙酰基和苯甲酰基。

[0084] “N-酰基”是指具有所述结构-N-C(＝O)-R的基团,其中R如针对酰基进行的定义。这些基团也能够称为酰胺。改性的N-酰基包括其中所述N-酰基的氧被S或NH取代的化合物,以及其中所述羰基(即-C(＝O)-)与除了氮的第二杂原子连接的化合物。例如,所述羰基能

够与第二个氮原子连接从而形成脲连接基(即,-NH-C(=O)-NH-R)。

[0085] 术语“氨基”是指$-NH_2$、-NHR和$-NR_2$基团,其中每个R独立地是烷基、取代烷基、芳基、取代芳基或芳烷基,以及N-杂环(例如,吗啉等)中的氨基和铵官能图。正如本文所用,所述术语“氨基”还能够是指提供季铵阳离子的取代基,如$-^{+}NH_3$、$-^{+}NH(R)_2$和$-^{+}N(R)_3$基团,其中每个R独立地是烷基、取代烷基、芳基、取代芳基或芳烷基。

[0086] 所述术语“酯”是指包含-O-C(=O)-R基团的部分,其中R能够是烷基、取代烷基、芳烷基、芳基或取代芳基。在一些实施方式中,所述R基团能够包括氨基取代基,而所述酯是氨基酯。

[0087] 所述术语“酰胺”是指包含-N(R’)-C(=O)-R基团的部分,其中R选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基或取代芳基,而R’是H、烷基、取代烷基、芳烷基、芳基或取代芳基。

[0088] 本文所用的所述术语“脲”能够是指包含-N(R’)-C(=O)-N(R’)-基团的部分,其中每个R’独立地是H、烷基、取代烷基、芳烷基、芳基或取代芳基。

[0089] 所述术语“羟基”是指-OH基团。

[0090] 当使用所述术语“独立地选择”时,所提及的所述取代基(例如,R基团,如基团R_1和R_2,或基团X和Y)能够相同或不同。例如,R_1和R_2都能够是取代烷基,或R_1能够是氢,而R_2能够是取代烷基,等。

[0091] 受试者

[0092] 进行治疗,筛选,测试或由其采集样品的受试者理想地是人受试者,尽管应该理解的是,所公开的主题的原理表明所述组合物和方法对无脊椎动物和对所有脊椎动物物种,包括哺乳动物,都是有效的,这些都旨在包括于所述术语“受试者”之中。此外,哺乳动物应该理解为包括其中筛选是所需要的任何哺乳动物物种,特别是农业和家养哺乳动物物种。

[0093] 所公开的方法、化合物和治疗特别适用于温血脊椎动物的测试、筛选和/或治疗。因此,本公开的主题涉及哺乳动物和鸟类。

[0094] 更具体而言,本文提供了对诸如人类的哺乳动物以及以下那些哺乳动物的测试、筛选和/或治疗:由于濒临灭绝(例如,西伯利亚虎)而具有重要性的那些哺乳动物、对于人类具有经济重要性(在农场饲养以供人类消费的动物)和/或社会重要性(作为宠物或在动物园中饲养的动物)的那些哺乳动物,例如,除了人类以外的食肉动物(如猫和狗),猪(swine)(家猪(pig)、肥猪(hog)和野猪(wild boar)),反刍动物(如牛、肉牛、羊、长颈鹿、鹿、山羊、野牛和骆驼)和马。本文还提供了对鸟类的治疗,包括对濒临灭绝的,在动物园中饲养的那些种类的鸟类,以及禽类,尤其是家禽,即肉禽(poultry),如火鸡、鸡、鸭、鹅、珍珠鸡等的治疗,因为它们对人类也具有经济重要性。因此,本文提供了对家畜的治疗,包括但不限于,家养猪(家猪和肥猪),反刍动物,马,家禽等。

[0095] 在一些实施方式中,根据本公开的主题使用的受试者是需要对其治疗和/或诊断的受试者。在一些实施方式中,受试者可以需要抗凝血疗法或相关病症或表型。在一些实施方式中,需要抗凝血治疗的受试者能够是具有高出血风险的受试者。

[0096] 制剂

[0097] 在一些实施方式中,本公开的主题的所述组合物包括含有药用载体的组合物。任何合适的药物制剂都能够用于制备给予受试者的所述腺病毒载体。

[0098] 例如,合适的制剂能够包括水性和非水性无菌注射溶液,其能够含有抗氧化剂、缓

冲剂、抑菌剂、抗生素和使所述制剂与预期接受者的体液等渗的溶质;水性和非水性无菌悬浮液,其能够包括悬浮剂和增稠剂。所述制剂能够以呈现于单位剂量或多剂量容器,例如,密封安瓿和小瓶中,并且能够储存于冷冻或冷冻干燥(冻干)条件下,仅需要在使用前立即添加无菌液体载体,例如,水,就能进行注射。一些示例性成分有SDS、甘露醇或另一种糖以及磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0099] 应当理解的是,除了上面具体提及的成分之外,本公开的主题的所述制剂能够包括本领域中关于所讨论的制剂类型的常规其他试剂。例如,能够使用无菌无热原水性和非水性溶液。

[0100] 给药

[0101] 本公开主题的所述组合物的给药能够通过本领域普通技术人员已知的任何方法来进行,包括但不限于,静脉内给药,滑膜内给药,透皮给药,肌内给药,皮下给药,局部给药,直肠给药,阴道内给药,肿瘤内给药,口服给药,颊部给药,鼻部给药,肠胃外给药,吸入和吹入。在一些实施方式中,用于给予本公开主题的组合物的合适方法包括,但不限于,静脉内给药。可替代地,组合物能够以任何其他方式置于需要治疗的部位上。给予本公开主题的组合物的具体方式取决于各种因素。

[0102] 剂量

[0103] 将有效剂量的本公开主题的所述组合物给予有此需要的受试者。"治疗有效量"是足以产生可测量反应(例如,抗凝血作用)的组合物的量。在一些实施方式中,治疗有效量是足以防止凝血作用即抗凝血作用的量。在一些实施方式中,治疗有效量是足以改善需要抗凝血剂治疗的受试者的健康、保持良好状态(well-being)、预后和/或生存能力的量。

[0104] 本公开主题的组合物中的活性成分的实际剂量水平能够进行变化从而给予有效实现具体受试者所需治疗反应的所述活性化合物的量。所选剂量水平能够取决于所述治疗组合物的活性、给药途径、与其他药物或治疗的组合、所治疗病症的严重程度和所治疗受试者的病症和既往病史。然而,以低于实现所希望的治疗效果所需的水平开始所述组合物的剂量并逐渐增加剂量直至达到所希望的效果,是在本领域技术范围内的。

[0105] 在阅读本文提供的本公开主题的公开内容后,本领域普通技术人员能够考虑所述具体制剂,与所述组合物一起使用的给药方法和所述病症的严重程度而定制给予个体患者的剂量。剂量的进一步计算可以考虑患者的身高和体重、症状的严重程度和阶段以及其他有害身体状况的存在。这种调节或变化,以及何时以及如何进行这种调节或变化的评价,对于医学领域的普通技术人员而言是公知的。

[0106] 实施例

[0107] 包括以下实施例以进一步说明本公开主题的各种实施方式。然而,根据本公开,本领域普通技术人员应该理解的是,在不脱离本公开主题的精神和范围的情况下,能够在所公开的具体实施方式中作出许多改变并仍然获得相同或相似的结果。

[0108] 材料和方法

[0109] 酶的表达和纯化

[0110] 使用Sf-900™III SFM(Life Technologies)在所述Sf9细胞(Invitrogen)中进行6-O-磺基转移酶1(6-OST-1)和6-O-磺基转移酶3(6-OST-3)的表达。浓度为2.0×10^{6}个细胞/mL的昆虫细胞通过表达小鼠6-OST-1和人6-OST-3的重组病毒进行感染,并使其在振荡

器中于27℃孵育96小时。所述培养溶液以4,000RPM离心10min而造粒沉淀(pellet)所述细胞。然后将含有1mM苯基甲磺酰氟(PMSF,100mM原溶液(stock solution)新制于95%乙醇中)、0.05%Triton X-100和0.2%甘油的上清液以8000RPM离心30min,并通过1.5μm膜过滤。然后将所得培养基与等体积的含有0.05% Triton-100和2%甘油的40mM 3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)缓冲液(pH 7.0)混合。使用肝素Toyopearl凝胶(Heparin Toyopearl gel)(Tosoh Bioscience)柱采用以下两种缓冲液纯化6-OST-1和6-OST-3:缓冲液A,含有20mM MOPS,pH 7.0,100mM NaCl,2%甘油和0.1%还原triton X-100(Sigma);和缓冲液B,含有20mM MOPS,pH7.0,1M NaCl,2%甘油和0.1%还原triton X-100。在载入所述培养基后,使用缓冲液A以4mL/min的流速洗涤所述柱直至280nM的UV吸光度达到基线。应用60min内0～100% B的梯度洗脱,并用100% B以1.5mL/min的流速另外洗脱所述柱60min。酶纯化在4℃下进行。

[0111] 使用BL21细胞在大肠杆菌中进行3-OST-1和3-OST-3的表达。对于3-OST-1和3-OST-3,所述转化的细胞在含有50μg/L卡那霉素的LB培养基中生长,并在37℃孵育直至OD600达到0.6～0.8。加入终浓度为0.2mM的异丙基硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)以诱导3-OST-1和3-OST-3的表达。所述细菌培养物在22℃下保持振荡过夜。通过以3400RPM旋转15min收获所述细菌细胞。将所述细胞再悬浮于25mL含有25mM Tris(pH 7.5)、30mM咪唑和500mM NaCl的缓冲溶液中。所述悬浮液超声处理并以14,000RPM离心30min。在纯化之前,所述上清液通过0.45μm膜进行过滤。使用镍-琼脂糖(GE Healthcare)柱采用以下两种缓冲液纯化所述蛋白:缓冲液C,含有25mM Tris(pH 7.5)、30mM咪唑和500mM NaCl;缓冲液D,含有25mM Tris(pH 7.5)、300mM咪唑和500mM NaCl。在载入所述培养基后,使用缓冲液C以流速2mL/min洗涤所述柱直至280nM的UV吸光度达到基线。然后使用缓冲液D洗脱所述蛋白。

[0112] 寡糖的化学酶促合成(化合物1～6)

[0113] 化合物1～3的合成由称之为“NS2S 6-链节底物”的六糖(GlcNS-GlcA-GlcNS-IdoA2S-GlcNS-GlcA-pNP)开始。为了合成化合物1,将所述底物(25mg)与1.8mM 3’-磷酸腺苷5’-磷酸硫酸酯(PAPS)在含有50mM MOPS(pH7.0)、10mM $MnCl_2$、7mM $MgCl_2$和2mL 3-OST-3(0.11mg/mL)的总体积为100mL的缓冲液中孵育。所述反应混合物在37℃下孵育过夜。通过将少量所述反应混合物注入阴离子交换HPLC(TSKgel DNA-NPR-柱(4.6mm×7.5cm,2.5μm,来自Tosoh Bioscience))而监测所述反应的完成。如果反应完成<60%,则加入另外的3-OST-3酶和PAPS,并将所述反应混合物在37℃下保持另18～24小时。如果所述反应完成,则所述反应混合物进行Q-Sepharose色谱(GE Healthcare)。

[0114] 为了合成化合物2,将化合物1(5mg)与6-OST-1、6-OST-3酶和1.3mM PAPS在含有100mM MOPS(pH 7.0)和1mL的6-OST-1和6-OST-3的酶混合物的总体积为100mL的缓冲液中37℃孵育过夜。通过向阴离子交换HPLC中注入少量所述反应混合物而监测所述反应的完成,并通过Q-Sepharose纯化所述产物。为了合成化合物3,将化合物2(4mg)与1.3mM PAPS在含有18mM MOPS(pH 7.0)、5mM $MnCl_2$、5mM $MgCl_2$和6mL 3-OST-1(4μg/mL)的总体积为100mL的缓冲液中进行孵育。将所述反应混合物在37℃下孵育过夜。通过向阴离子交换HPLC中注入少量所述反应混合物而监测所述反应的完成,并通过Q-Sepharose纯化所述产物。

[0115] 为了合成化合物4～6,使用称为NS2S8-链节底物的八糖(GlcNS-GlcA-GlcNS-IdoA2S-GlcNS-IdoA2S-GlcNS-GlcA-pNP)作为所述起始材料。为了合成化合物4,将30mg所

述底物与2mM PAPS在含有33mM MOPS(pH 7.0)、10mM $MnCl_2$、5mM $MgCl_2$和4mL 3-OST-3(0.11mg/mL)的总体积为90mL的缓冲液中孵育。所述反应混合物在37℃下孵育过夜。通过将少量所述反应混合物注入阴离子交换HPLC而监测所述反应的完成。如果所述反应完成<60%,则加入另外的3-OST-3酶和PAPS,并将所述反应混合物在37℃下保持另外18~24小时。如果所述反应完成,则所述反应混合物进行Q-Sepharose色谱(GE Healthcare)。

[0116] 为了合成化合物5,将化合物4(22mg)与6-OST-1、6-OST-3酶和0.8mM PAPS在含有100mM MOPS(pH 7.0)和3mL 6-OST-1和6-OST-3混合物的总体积为100mL的缓冲液中37℃孵育过夜。通过向阴离子交换HPLC中注入少量所述反应混合物而监测所述反应的完成,并通过Q-Sepharose纯化所述产物。为了合成化合物6,将化合物5(6.5mg)与1.3mM PAPS在含有18mM MOPS(pH7.0)、5mM $MnCl_2$、5mM $MgCl_2$和4.5mL 3-OST-1的总体积为100mL(4μg/mL)的缓冲液中孵育。所述反应混合物在37℃下孵育过夜。通过向阴离子交换HPLC中注入少量所述反应混合物而监测所述反应的完成,并通过Q-Sepharose纯化所述产物。

[0117] 3-OST-1和3-OST-3的底物特异性

[0118] 为了确定3-OST-1和3-OST-3的所述底物要求,使用了不同尺寸的结构均一的寡糖。这些寡糖包括N-硫酸化和2-O-硫酸化的6-链节~12-链节(6-链节2S~12-链节2S)和N-硫酸化的、2-O-硫酸化的和6-O-硫酸化的6-链节~12-链节(6-链节2S6S~12-链节2S6S)。这些寡糖通过所述化学酶促法1制备,其结构如图5C中所示。将这些寡糖(0.033mM)在含有50mM MOP(pH 7.0)、10mM $MnCl_2$、5mM $MgCl_2$、2.5μL 3-OST-1或3-OST-3和30μM与[35S]PAPS($(1\sim3)\times10^5$cpm)混合的PAPS的100μL反应缓冲液中37℃孵育1h。向所述反应混合物中加入含有1.4mM EDTA、50mM乙酸钠和150mM NaCl的900μL 3M脲从而淬灭所述反应。然后所述反应混合物使用所述DEAE-柱进行纯化。

[0119] 3-OST-3针对不同寡糖底物的动力学分析

[0120] 所述酶动力学通过孵育30μL对于具有N-硫酸化和2-O-硫酸化的寡糖的纯化3-OST-3或60μL对于具有N-硫酸化、2-O-硫酸化和6-O-硫酸化的寡糖的纯化3-OST-3的混合物进行表征。将PAPS(120μM)与1×10^5cpm作为硫酸盐供体的[35S]PAPS和0~200μM的不同浓度的寡糖在37℃下混合1h。所述反应物加载至DEAE柱上从而纯化所述35S-标记寡糖产物。35S-标记寡糖产物的量相对于底物浓度作图,然后使用Sigma Plot软件对Michalis-Menten曲线图进行曲线拟合从而获得Km和Vmax值。

[0121] 通过Q-Sepharose纯化化合物1~6

[0122] 用Q-Sepharose柱进行硫酸化寡糖的纯化。流动相A为25mM Tris,pH 7.5。流动相B含有25mM Tris和1M NaCl,pH 7.5。所述洗脱梯度则基于合成的寡糖的硫酸酯基团数,流速为1mL/min。扫描并记录310nM和260nM的吸收。纯化后,所述样品使用1000MWCO膜针对含有5mM磷酸氢二钠的缓冲液(pH 7.5)透析两次。

[0123] 合成寡糖的HPLC分析

[0124] 采用TSKgel DNA-NPR-柱检测所述反应的完成程度和在纯化后的合成寡糖纯度。流动相A为25mM Tris,pH 7.5。流动相B是25mM Tris和1M NaCl,pH 7.5。所述梯度步骤是100min内的0~100% B,流速为0.4mL/min。使用310nM和260nM的吸收监测所述洗脱液。

[0125] 寡糖的ESI-MS分析

[0126] 通过ESI-MS(Thermo LCQ-Deca)测定合成寡糖的分子量构象(conformation)。

ESI-MS分析按照负离子模式并采用以下参数进行:3.0kV的I喷雾电压,120℃的去溶剂化曲线温度(curved desolvation line temperature)。所述质量范围设定于300～1000。

[0127] 3-O-[34S]硫酸化化合物3的制备

[0128] 为了合成3-O-[34S]硫酸化化合物4,将所述底物NS2S 8-链节(2mg)与3-OST-3酶(0.11mg/mL)和0.1mM[34S]PAPS在含有38mM MOPS(pH 7.0)、10mM $MnCl_2$、5mM $MgCl_2$和6mL 3-OST-3的总体积为20mL的缓冲液中孵育。所述反应混合物在37℃下孵育过夜。使用Q-Sepharose柱进行产物纯化。

[0129] 3-OST-3改性的八糖的串联(tandem)MS分析

[0130] 所述串联质谱分析(tandem mass spectra analysis)在Thermo LTQ-FT仪上按照负离子模式,采用以下仪器参数获得:I喷雾电压(kV),-3.5kV;毛细管电压(kV),-40kV;管透镜(V),-50V;和毛细管温度,275℃。对于所述串联质谱,所选择的前体离子采用以下参数进行:Iso宽度(m/z):3.0,归一化碰撞能量(%):50.0,Act.Q:0.250,Act.时间:30,最大注入时间(ms):500.000。通过使用Xcalibur 2.2软件记录和处理所述MS和MS/MS数据。

[0131] 通过NMR的化合物1～6的结构分析

[0132] NMR实验在298K下在带有Topsin 3.2软件的Bruker Avance 700MHz和850MHz光谱仪上进行。样品(0.5～3.0mg)每一个都溶于0.5mL D_2O(99.996%,Sigma-Aldrich)中并冻干三次以除去可交换的质子。所述样品重新溶解于0.5mL D_2O中并转移到NMR微管(O.D.5mm,Norrell)中。化学位移参照外部2,2-二甲基-2-硅杂戊烷-5-磺酸钠盐(DSS,Sigma,Co.)。加入氘代EDTA(Sigma,Co.)从而消除顺磁离子的影响。1D 1H-NMR实验“zg”脉冲序列采用64次扫描和3.8秒采集时间进行实施。1D 13C-NMR实验“zgdc30”脉冲序列采用10,000次扫描和1.0秒采集时间进行实施。2D 1H-13C HSQC实验“hsqcgpph”脉冲序列采用48次扫描、512增量、1.5秒弛豫延迟和120毫秒采集时间进行实施。2D谱采用GARP碳脱耦进行记录。使用48次虚拟扫描(dummy scan)之后才开始采集。在f2中收集了2048个全部点(point)。^{13}C发射器偏移设定于90.0ppm。

[0133] 分子动力学预处理

[0134] 使用所述AT-五糖复合物(PDB ID:3EVJ)的现有晶体结构作为所述系统的起始结构[47]。氨基酸残基25-33和396在所述晶体结构中未被解析,因此采用Modeller的Chimera界面生成[48-51]。去除所述N-聚糖,因为它们距离磺达肝素配体较远(>15 Å)。采用tleap对所述原始配体改性,用于各种模拟,并采用Chimera进行手动调节。所述氨基酸和碳水化合物残基的参数获自所述ff14SB7和GLYCAM06(J-1)力场[53,54]。所述体系采用Na+离子中和,并用所述TIP3P水模型在所述复合物周围12Å的截短八面体盒中进行溶剂化。

[0135] 分子动力学方案

[0136] 使用来自AMBER14的pmemd.cuda模块进行能量最小化和MD模拟[52]。在整个所述过程的每个步骤中,所述蛋白主链的Cα原子受到笛卡尔约束(10kcal/mol $Å^2$)限制。两个所述模拟需要对IdoA2S残基d(图4A)进行内部约束以维持$^1C_4$或$^2S_0$构象,并根据先前描述的设置进行实施[55]。在最初的1000个循环中使用最速下降法(steepest descent method)最小化所述系统之后在剩余24,000个循环中切换到共轭梯度(conjugate gradient)。为了有助于产生所述AT-寡糖复合物的稳定构型,使用不同原子约束进行两次最小化。最初,每个溶质原子

都受到约束。随后,去除对所述蛋白的配体和侧链的约束。静电相互作用采用Particle-Mesh Ewald算法进行处理[56],并使用针对非键合相互作用的8 Å截止值。所述SHAKE算法应用于含氢的键,使之能够使用2fs的积分时间步长(integration time step)。通过使用具有1ps的耦合时间常数的Berendsen恒温器,在NVT条件下60ps内将所述系统加热至300K,并允许在NPT条件下平衡总共50ns。还在NPT条件下,另外150ns内收集平衡后数据集。

[0137] 模拟数据分析

[0138] 使用所述MPBSA.py.MPI模块[52],采用单轨迹分子力学-广义生成溶剂可及表面积(single-trajectory Molecular Mechanics-Generalized Born Solvent Accessible Surface Area method)(MM-GBSA)方法[57]计算相互作用能。在分析之前,从每个复合物中去除所有水分子和离子,并通过所述GB隐式溶剂化模型(GB implicit solvation model)(igb＝2)[58]近似去溶剂化能量的贡献。所述模拟分成5ns箱(bin)和由每个箱内均匀分布的100个快照(snapshot)的全体(ensemble)计算的平均相互作用能量贡献。采用GraphPad Prism for Windows version 5.04进行统计学分析。根据t-检验分析,基于p值≤0.0001确定显著性。采用可视分子动力学(Visual Molecular Dynamics)程序创建图像[59]。

[0139] 体外抗-FXa活性的测定

[0140] 用含有1mg/mL牛血清白蛋白(BSA)的PBS将因子Xa(Enzyme Research Laboratories,South Bend,IN)稀释至60nM。在含有1mg/mL BSA的浓度为0.65μM的PBS中制备人抗凝血酶(AT)(来自Cutter Biological)。将所述显色底物S-2765(Diapharma)溶解于水中从而制备1mg/mL原液。所述寡糖采用PBS制成不同浓度(10～200nM)。所述溶液是60μL AT和15μL样品溶液的混合物,将其进行涡旋并在室温下孵育2min。然后加入因子Xa(90μL)并在室温下孵育4min,然后加入30μL S-2765。基于其405nm吸光度,连续测量所述反应混合物长达2min。将IC_{50}值的计算结果作为样品浓度相对于初始反应速率的函数进行作图。

[0141] 体内抗-FXa效应的测定

[0142] 所有研究均在北卡罗来纳大学的研究所动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)(IACUC)批准的方案下遵循实验室动物护理和使用的公共卫生服务(Public Health Service)指导而进行实施。将16只400g路易斯(Lewis)大鼠平均分成4组。每组静脉内给药无内毒素磺达肝素(0.46μM kg^{-1})、化合物11(0.43μM kg^{-1})、化合物5(0.42μM kg^{-1})或盐水。然后在给予所述化合物后的指定时间点(0.5、1、2、4、8小时)抽取血液,在给药前立即采集一个样品。在注射所述化合物后0.5、1、2、4和8小时之时,从对侧股动脉/隐静脉(contralateral femoral/saphenous vein)中抽取0.8mL血液至150mM柠檬酸盐中,注射前立即抽取一个样品。将所述样品离心而获得约400μL血浆。所述血液样品进行FXa活性分析。定期皮下给予盐水从而维持流体体积(fluid volume)。

[0143] 药物治疗动物的寡糖清除率测定

[0144] 使用针对每种化合物生成的校准曲线,对于每个相应的FXa活性百分比读出所述反应混合物中的化合物浓度。对每个时间点计算出平均血浆浓度和每组所述4只大鼠之间的标准偏差;使用这些值绘制出血浆浓度相对于时间的曲线图。

[0145] 实施例1

[0146] 携GlcNS3S和GlcNS3S6S残基的寡糖的化学酶促合成

[0147] 在本研究中完成了六糖(化合物1～3,图1A)和八糖(化合物4～6,图1A)的合成。使

用两种3-O-磺基转移酶(3-OST)同种型(3-OST-1和3-OST-3)将GlcNS3S±6S残基安装于不同糖序列中。所述3-OST-1酶引入硫酸化从而形成GlcNS3S6S残基,其在所述非还原末端与GlcA残基连接,形成-GlcA-GlcNS3S6S-的二糖单元;而所述3-OST-3酶引入硫酸化从而形成GlcNS3S残基,其在所述非还原末端与IdoA2S残基连接,形成-IdoA2S-GlcNS3S-的二糖单元。尽管在许多研究中已经成功地将3-OST-1用于合成寡糖[16,17,27,28],但使用3-OST-3合成包含所述-IdoA2S-GlcNS3S-二糖单元的寡糖却尚无报道。

[0148] 本文公开了3-OST-3和3-OST-1具有不同底物要求的发现。所述3-OST-1酶硫酸化携带6-O-硫酸化的寡糖底物,同时对无6-O-硫酸化的寡糖底物表现出非常低的反应性(图5A和图5B),这与先前描述的结论是一致的[16]。相对而言,3-OST-3优先硫酸化不携带6-O-硫酸化的寡糖(图5A和图5B),但这些6-O-硫酸化寡糖底物对3-OST-3改性的反应活性却较低(图5A,图5B和图5C)。动力学分析的结果表明,3-OST-3对于无6-O-硫酸化的寡糖底物具有更高的催化效率,这通过k_{cat}/K_m值进行确定(表1)。

[0149] 表1. 3-OST-3针对寡糖底物的动力学参数

	6链节2s	6链节2S6S	8链节2S	8链节2S6S
Km (μM)	364.5	20.7	86.9	23.1
k_{cat} (min^{-1})	0.49	0.018	0.73	0.095
k_{cat}/K_m $10^5\times(M\times min)^{-1}$	0.013	0.0086	0.084	0.041

[0150]

	10链节2s	10链节2S6S	12链节2S	12链节2S6S
K_m (μM)	44.1	16.6	31.4	7.7
k_{cat} (min^{-1})	0.49	0.05	0.61	0.03
k_{cat}/K_m $10^5\times(M\times min)^{-1}$	0.1	0.03	0.2	0.04

[0151] 正如本文所公开,3-OST-1和3-OST-3的不同底物要求的发现导致了开发合成含不同3-O-硫酸化糖序列的寡糖的两种单独方案。为了合成含有所述IdoA2S-GlcNS3S±6S二糖单元的寡糖(化合物1、2、4和5,分别如图6A,图6B,图6D和图6E所示),通过3-OST-3的3-O-硫酸化在6-O-硫酸化步骤之前引入(图1B),而为了合成含有所述GlcA-GlcNS3S6S二糖单元的寡糖,通过3-OST-1的所述3-O-硫酸化在6-O-硫酸化步骤之后进行(图1B)(化合物3和6,如图6C和图6F所示)。所述AT结合结构域包含-GlcNS(或Ac)6S-GlcA-GlcNS3S±6S-IdoA2S-GlcA-GlcNS6S-的五糖单元,其中为了高结合亲和力可能需要所述3-O-硫酸化[24,29]。在该研究中测试的所有所述寡糖中,仅化合物8和11含有所述五糖单元。

[0152] 实施例2

[0153] 寡糖的结构和构象分析

[0154] 对化合物1~6进行纯度和结构分析,分析图6E中所示的化合物6的代表性数据如图2A和图2B中所示。通过高分辨率阴离子交换HPLC,化合物6作为单峰洗脱,表明所述化合物是纯的(图2A)。通过电喷雾电离质谱(ESI-MS)测定化合物6的分子量为2449.43±0.74,其非常接近计算分子量2448.92(图2B)。化合物6的所述1H-NMR谱清楚地显示出8个异头质子,证实了所述产物是八糖。为了在化合物4中定位所述3-O-磺基,进行了串联MS分析。在该分析中,通过所述3-OST-3酶引入稳定的同位素标记[34S]磺基,使我们能够明确地鉴定化

合物4中残基d处的3-O-磺基的存在。由于化合物4是化合物5和6的中间体,则化合物4的串联MS分析也有助于定位化合物5和6中的所述IdoA2S-GlcNS3S6S二糖单元。

[0155] IdoA2S残基的吡喃糖环在不同构象之间相互转化,包括椅式(1C4和4C1)和扭船式($^2S_0$)(图1C)。研究了3-O-硫酸化对邻近IdoA2S残基的构象的影响。所述构象分析使用NMR通过测量所述三键质子-质子偶合常数(3JH-H)[30]完成。相比于不含所述GlcNS3S6S残基的六糖(化合物7)中的所述IdoA2S残基的那些,所述3-O-硫酸化增加了六糖中所述IdoA2S残基的$^2S_0$构象异构体(conformer)的群体(population)(化合物1～3,表2和图1A)。在化合物3中,所述IdoA2S残基几乎仅显示所述$^2S_0$构象。对于八糖(化合物4～6,表2和图1A),存在两个IdoA2S残基,称为残基c和e。3-O-硫酸化对所述$^2S_0$群体的影响是不同的。例如,与无GlcNS3S6S残基的八糖(化合物10)中的IdoA2S残基的那些相比,3-O-硫酸化增加了化合物5中显示出的侧翼IdoA2S残基的所述$^2S_0$群体。在化合物11中,残基f上的所述3-O-硫酸化增加了所述相邻IdoA2S残基(残基e)的$^2S_0$群体,但与化合物10中的相应残基相比,对远端IdoA2S残基(残基c)没有影响。在化合物6中,残基d和f上的3-O-硫酸化增加了残基e的所述$^2S_0$群体,但与来自化合物5的相应残基相比,残基c的$^2S_0$群体从71％减少到58％(表2)。这些观察表明3-O-硫酸化能够通过其对IdoA2S残基构象的影响而调节HS的结构。

[0156] 表2. GlcNS3S6S或GlcNS3S残基对寡糖中IdoA2S的构象异构体(conformer)群体(population)的影响

[0157]

	化合物：寡糖结构缩写	IdoA2S残基的位置	测定的^3JH-H耦合(Hz)(计算的^3JH-H耦合)				构象异构体的群体[b]			差方的总和[c]
			$^3JH1$-$H2$	$^3JH2$-$H3$	$^3JH3$-$H4$	$^3JH4$-$H5$	$^1C_4$	^2S_O	$^4C_1$	
六糖	化合物7: GlcNS-GlcA-GlcNS-IdoA2S-GlcNS-GlcA-pNP[d]	c	2.2 (2.7)[a]	4.3 (4.1)	3.2 (3.0)	2.3 (2.2)	68 %	32 %	--	0.34
六糖	化合物1: GlcNS-GlcA-GlcNS-IdoA2S-**<u>GlcNS3S</u>**-GlcA-pNP[e]	c	2.6 (3.1)	5.0 (4.7)	3.3 (3.3)	2.5 (2.3)	58 %	42 %	--	0.38
六糖	化合物2: GlcNS6S-GlcA-GlcNS6S-IdoA2S-**<u>GlcNS3S6S</u>**-GlcA-pNP	c	4.1 (4.8)	7.8 (7.3)	3.9 (4.3)	3.2 (2.9)	19 %	81 %	--	0.99
六糖	化合物3: GlcNS6S-GlcA-**<u>GlcNS3S6S</u>**-IdoA2S-**<u>GlcNS3S6S</u>**-GlcA-pNP	c	4.8 (5.5)	9.0 (8.4)	4.3 (4.8)	3.5 (3.1)	-- (1 %)	99 %	--	1.26
八糖	化合物9: GlcNAc-GlcA-GlcNS-IdoA2S-GlcNS-IdoA2S-GlcNS-GlcA-pNP	c e	2.5 (3.0) 2.1 (2.5)	4.7 (4.6) 4.0 (3.7)	3.5 (3.3) 3.3 (3.0)	2.5 (2.3) 2.3 (2.1)	62 % 72 %	37 % 24 %	-- (2 %) -- (3 %)	0.34 0.38
八糖	化合物4: GlcNS-GlcA-GlcNS-IdoA2S-**<u>GlcNS3S</u>**-IdoA2S-GlcNS-GlcA-pNP	c e	2.8 (3.3) 2.2 (2.7)	5.3 (5.1) 4.4 (4.2)	3.5 (3.4) 3.3 (3.1)	2.7 (2.4) 2.5 (2.2)	53 % 67 %	47 % 33 %	-- --	0.39 0.42
八糖	化合物10: GlcNS6S-GlcA-GlcNS6S-IdoA2S-GlcNS6S-IdoA2S-GlcNS6S-GlcA-pNP	c e	3.1 (3.8) 3.2 (3.8)	6.1 (5.8) 6.1 (5.8)	3.8 (3.7) 3.8 (3.7)	2.8 (2.5) 2.9 (2.5)	42 % 41 %	58 % 59 %	-- --	0.68 0.62
八糖	化合物5: GlcNS6S-GlcA-GlcNS6S-IdoA2S-**<u>GlcNS3S6S</u>**-IdoA2S-GlcNS6S-GlcA-pNP	c e	3.6 (4.3) 3.9 (4.5)	7.0 (6.6) 7.3 (6.9)	4.0 (4.1) 4.0 (4.2)	3.1 (2.7) 3.0 (2.8)	29 % 25 %	71 % 75 %	-- --	0.82 0.60
八糖	化合物6: GlcNS6S-GlcA-**<u>GlcNS3S6S</u>**-IdoA2S-**<u>GlcNS3S6S</u>**-IdoA2S-GlcNS6S-GlcA-pNP	c e	3.0 (3.8) 4.1 (4.8)	6.1 (5.8) 7.8 (7.3)	3.9 (3.7) 3.9 (4.3)	2.9 (2.5) 3.2 (2.9)	42 % 19 %	58 % 81 %	-- --	0.93 0.99
八糖	化合物11: GlcNAc6S-GlcA-**<u>GlcNS3S6S</u>**-IdoA2S-GlcNS6S-IdoA2S-GlcNS6S-GlcA-pNP	c e	3.1 (3.7) 3.6 (4.4)	6.1 (5.7) 7.2 (6.7)	3.7 (3.7) 4.1 (4.1)	2.8 (2.5) 3.1 (2.7)	43 % 27 %	57 % 73 %	-- --	0.61 1.05

[0158] a.计算值(在括号中给出)使用采用具有GLYCAM06参数的Amber14获得[45]。

[0159] b.在先前的出版物中描述了耦合常数的测量值向不同构象异构体群体的转换[30]。

[0160] c.残差平方和(residual sum of square)(RSS)用于确定计算群体比率与实验数据的拟合情况。

[0161] d.在先前发表的文章中报道了化合物7的构象群体。

[0162] e.3-O-硫酸化葡糖胺(GlcNS3S或GlcNS3S6S)的位置用粗体和下划线表示。

[0163] 实施例3

[0164] 所述-GlcNS3S6S-IdoA2S-二糖单元的存在影响抗凝血活性。

[0165] HS寡糖通过与AT的相互作用而实现其抗凝血活性,因此显示出抗-FXa活性的寡糖应该结合于AT。检查了围绕所述GlcNS3S6S残基的糖残基对所述AT-结合以及抗-FXa活性的影响。这些数据表明,-GlcNS3S6S-IdoA2S-二糖单元(即,位于所述GlcNS3S6S残基的还原末

端上的IdoA2S)的存在能够在确定抗凝血活性中发挥作用(表3)。化合物2和8具有6个残基、8个磺基、1个IdoA2S和2个GlcA残基,但仅化合物8表现出抗-FXa活性(图3A和表3)。正如所预期,AT紧密结合于化合物8的Kd值为7±2nM,但并不与化合物2结合(表3)。在结构上,所述化合物在所述IdoA2S残基的位置上是不同的。在化合物8中,所述3-O-硫酸化葡糖胺(GlcNS3S6S)残基在所述还原端上侧接IdoA2S残基,从而使其具有所述-GlcNS3S6S-IdoA2S-二糖单元,而化合物2中的所述GlcNS3S6S在所述还原端上侧接GlcA残基,从而使其具有所述-GlcNS3S6S-GlcA-二糖单元。

[0166] 表3.二糖结构域(-GlcNS3S6S-IdoA2S-)与AT结合常数(Kd)以及抗-FXa活性(IC50)之间的相关性

[0167]

	结构缩写	与AT的结合亲和力(Kd) (nM)	抗-FXa活性(IC50, nM)
磺达肝素，5-链节	GlcNS6S-GlcA-**<u>GlcNS3S6S-IdoA2S</u>**-GlcNS6S-OMe[a]	14.8 ± 1.4 nM	12.2 nM
六糖			
化合物8[b]	GlcNS6S-GlcA-**<u>GlcNS3S6S-IdoA2S</u>**-GlcNS6S-GlcA-pNP	7 ± 2 nM[b]	9.1 nM
化合物2	GlcNS6S-GlcA-GlcNS6S-IdoA2S-GlcNS3S6S-GlcA-pNP	未结合	未抑制
化合物3	GlcNS6S-GlcA-**<u>GlcNS3S6S-IdoA2S-G</u>**lcNS3S6S-GlcA-pNP	未测定	11.0 nM
含IdoA的6-链节	GlcNS6S-GlcA-**<u>GlcNS3S6S-IdoA</u>**-GlcNS6S-GlcA-pNP[c]	32.6 ± 5.3 nM[d]	29.2 nM[d]
含GlcA2S的6-链节	GlcNS6S-GlcA-GlcNS3S6S-GlcA2S-GlcNS6S-GlcA-pNP[4]	未结合[d]	未测定
八糖			
化合物4	GlcNS-GlcA-GlcNS-IdoA2S-**<u>GlcNS3S-IdoA2S</u>**-GlcNS-GlcA-pNP	未结合[c]	未抑制
化合物5	GlcNS6S-GlcA-GlcNS6S-IdoA2S-**<u>GlcNS3S6S-IdoA2S</u>**-GlcNS6S-GlcA-pNP	5.1 ± 1.4 nM	7.7 nM
化合物6	GlcNS6S-GlcA-**<u>GlcNS3S6S-IdoA2S</u>**-GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6S-GlcA-pNP	5.6 ± 2.6 nM	10.9 nM
化合物11	GlcNAc6S-GlcA-**<u>GlcNS3S6S-IdoA2S</u>**-GlcNS6S-IdoA2S-GlcNS6S-GlcA-pNP	8 ± 3 nM[1]	9.4 nM

[0168] a.磺达肝素(FDA批准的抗凝血剂),用作抗-FXa活性测量和与AT结合的阳性对照。所述-GlcNS3S6S-IdoA2S-二糖单元以粗体和下划线表示。

[0169] b.化合物8和化合物11的结合常数通过如先前出版物中报道的亲和共电泳确定[17]。

[0170] c.化合物4不与AT结合也未表现出抗-FXa活性,这是因为它在非还原末端的GlcNS残基处不含6-O-磺基基团[29]。

[0171] d.含IdoA的6-链节报道于之前的出版物中[30]。IdoA还表现出$^1C_4$和$^2S_0$构象。所述含GlcA2S的6-链节报道于之前的出版物中[8]。

[0172] 本文的发现与先前发表的结论一致,即所述$^2S_0$构象影响抗凝血活性[9]。化合物8中的所述IdoA2S残基表现出所述$^2S_0$构象;而在化合物2中,该位置则被采用所述$^4C_1$构象的GlcA残基占据。AT和磺达肝素的复合物的X-射线晶体结构和NMR溶液结构表明,所述IdoA2S残基在所述复合物中以$^2S_0$构象存在[31,32]。其中所述IdoA2S残基被表现出$^2S_0$构象的IdoA残基取代的含IdoA的6-链节表现出抗-FXa活性[30](表3)。然而,其中IdoA2S残基被表现出$^4C_1$构象的GlcA2S残基取代的含GlcA2S的6-链节并不表现出抗-FXa活性[8](表2)。化合物3表现出强抗-FXa活性,因为所述6-链节由两个GlcNS3S6S残基构成(图3A和表3),与之前报道的由类似的五糖结构域构成的八糖的结果[32]一致。化合物3中的残基d和c构成所述-GlcNS3S6S-IdoA2S-二糖单元。

[0173] 实施例4

[0174] 所述AT-结合结构域中的GlcA残基能够被IdoA2S残基取代

[0175] 这些研究揭示了一种新的AT-结合糖序列。目前已知的AT-结合序列包含二糖-GlcA-GlcNS3S±6S-单元[33]。用HS中的所述-IdoA2S-GlcNS3S6S-二糖单元取代-GlcA-GlcNS3S6S-二糖单元被认为消除了AT-结合亲和力[34,35]。来自所述抗-FXa活性的数据和所述

8-链节的AT-结合分析显然挑战了这一论断。含所述-IdoA2S-GlcNS3S6S-(但不是-GlcA-GlcNS3S6S-)二糖单元的化合物5显示出强的抗-FXa活性(表3)。使用等温滴定量热法(ITC)的所述AT-结合亲和力分析也证实了化合物5紧密结合于AT(图3B和表3)。化合物6表现出抗-FXa活性和高AT-结合亲和力(表3),因为该8-链节含有所述-GlcA-GlcNS3S6S-二糖单元。

[0176] 在使用大鼠模型的体内实验中进一步证实了化合物5的抗凝血活性。为此,给予化合物5并将所述抗-FXa效应与磺达肝素和化合物11进行比较,化合物11是先前报道的抗凝血八糖[17]。所述结果证实化合物5在给药所述药物后30min内具有与磺达肝素和化合物11(图3C)可比较的抗-FXa效力。然而,来自化合物5的所述抗-FXa作用在4小时后减少,而来自磺达肝素和化合物11的所述抗-FXa作用在8小时后得以持续(图3C)。还获取了血液样品中的药物浓度以确定每种化合物在体内的清除率(图3D)。与磺达肝素和化合物11相比,化合物5在最初的2小时内从所述动物中清除更快。

[0177] 所述AT-结合位点中的残基d的结构杂乱性(promiscuity)(图4A)由AT在与各种改性的HS五糖复合物中的分子动力学(MD)模拟支持。首先通过取代已知对于在AT和磺达肝素的现有共晶结构中的AT结合而言重要的部分验证所述计算技术[24,36]。对结合自由能的计算证实,去除所述残基c上的3-O-硫酸酯或用GlcA取代残基b会使所述复合物失稳,这分别由相互作用能量显著减弱29%和17%所指示,与实验数据在定性上是一致的。相对而言,用在$^1C_4$构象中的IdoA2S取代GlcA(残基d)对自由能没有影响(图4B)。有趣的是,用在$^2S_0$构象中的IdoA2S残基取代适度地增强结合能12%(图4B),表明如果残基d是在$^2S_0$构象异构体中的IdoA2S,则存在更稳定的AT/五糖复合物的可能性。两种构象中的IdoA2S能够维持所述羧基部分相对于所述蛋白的与磺达肝素模拟中针对所述GlcA残基发现的相似的位置。总体而言,所述MD数据支持以下结论:用IdoA2S残基取代残基d不会降低对AT的结合亲和力,并解释了尽管缺乏针对AT的经典五糖序列,化合物5如何发挥活性抗凝血剂的作用。

[0178] 实施例5

[0179] 7-链节HS化合物的分析

[0180] 使用所公开的合成方法开发了7-链节HS化合物或肝素类似物。所述7-链节(其结构如图8B所示),测试并证实了其抗-Xa活性(图8A)。图8B示意性地将所述7-链节的化学结构与本文公开的6-链节和8-链节进行了比较。举例而非限制而言,用于合成所述7-链节的至少一种合成路径如图8C中所示。在一些实施方式中,能够优选具有相对较短的寡糖,如7-链节,因为这能够降低与合成相关的成本。

[0181] 实施例6

[0182] 结果的讨论

[0183] 本文公开了使用化学酶促方法制备3-O-硫酸化寡糖库的方案。本文证实,为了合成包含所述-IdoA2S-GlcNS3S-或-IdoA2S-GlcNS3S6S-二糖单元的寡糖,所述3-OST-3改性必须在所述6-O-硫酸化步骤之前进行,而3-OST-1改性能够仅仅发生于6-O-硫酸化后,从而产生所述-GlcA-GlcNS3S6S-二糖单元。该发现得到3-OST-1/七糖/PAP[37]和3-OST-3/四糖/PAP[38]的三元共晶结构的支持(ternary cocrystal structure)。3-OST-3与来自所述四糖底物的6-O-磺基之间没有相互作用,这与3-OST-3的寡糖底物不需要6-O-硫酸化的结论是一致的。相对而言,观察到3-OST-1和来自所述七糖底物的6-O-磺基之间的相互作用,表明需

要6-O-硫酸化以结合至3-OST-1。3-OST-1和3-OST-3之间的不同的且独特的底物要求提高了由3-OST不同的同种型改性的3-O-硫酸化HS通过不同路径进行生物合成的可能性。

[0184] 人们普遍认为,所述3-OST-1酶负责合成抗凝血剂HS,而所述3-OST-3酶则并非如此[34,35]。到目前为止分离的AT-结合序列全部由所述-GlcA-GlcNS3S6S-二糖重复单元构成,其是3-OST-1酶改性的产物[33,39]。尽管作为3-OST-3酶改性产物的化合物5不含所述-GlcA-GlcNS3S6S-二糖单元,但它结合至AT并表现出抗凝血活性。这些发现表明只要所述HS包含类似于化合物5的所述结构的结构域,3-OST-3能够合成抗凝血剂HS。

[0185] 化合物5的快速清除提供了具有降低的出血风险的潜在新型短效抗凝药物候选物。短效抗凝药物(其能够在出现大出血效应之前迅速从所述循环中清除),将会对出血风险高的患者特别有益[41]。虽然未分级的肝素是一种半衰期短的抗凝剂,但令人担忧的是该药物会引起肝素诱导血小板减少症(HIT),这是一种危及生命的副作用[42]。据已经发现,小于12-链节的短寡糖[43]不与血小板因子4结合,由此并不表现出HIT风险。因此,作为八糖,化合物5预期会具有非常低的HIT风险。3-O-硫酸化寡糖的可用性也为研究糖类硫酸化/构象与生物功能之间的偶然关系提供了机会,这是剖析HS结构和功能关系的重要一步。HS 3-OST存在于七种不同的同种型中。在本研究中,我们证实了3-OST-1和3-OST-3需要不同的化学酶促方案以制备不同的3-O-硫酸化寡糖序列。该研究的结论将指导其他人使用不同3-OST同种型开发出化学酶促方法,允许制备出具有涉及3-O-硫酸化葡糖胺残基的更广泛的硫酸化模式的更复杂的HS糖。这些研究将丰富所述HS寡糖库从而辅助HS-相关的研究。

[0186] 参考文献

[0187] (1)Xu,D.;Esko,J.Annu Rev Biochem.2014,83,129.

[0188] (2)Xu,D.;Olson,J.;Cole,J.N.;van Wijk,X.M.;Brinkmann,V.;Zychlinsky,A.;Nizet,V.;Esko,J.D.;Chang,Y.C.Infect.lmmun.2015,83,3648.

[0189] (3)Patel,V.N.;Lombaert,I.M.A.;Cowherd,S.N.;Shworak,N.;Xu,Y.;Liu,J.;Hoffman,M.P.Developmental cell 2014,29,662.

[0190] (4)Liu,J.;Linhardt,R.J.Nat Prod Rep 2014,31,1676.

[0191] (5)Kreuger,J.;Spillmann,D.;Li,J.-p.;Lindahl,U.J.Cell Biol.2006,174,323.

[0192] (6)Sattelle,B.M.;Hansen,S.U.;Gardiner,J.M.;Almond,A.J Am Chem Soc 2010,132,13132.

[0193] (7)Sattelle,B.M.;Almond,A.Glycobiology 2011,21,1651.

[0194] (8)Hsieh,P.;Xu,Y.;Keire,D.A.;Liu,J.Glycobiology 2014,24,681.

[0195] (9)Das,S.;Mallet,J.;J,E.;Driguez,P.;Duchaussoy,P.;Sizun,P.;Herault,J.;Herbert,J.;M,P.;P,S.Chemistry 2001,7,4821.

[0196] (10)Raman,R.;Venkataraman,G.;Ernst,S.;Sasisekharan,R.Proc.Natl.Acad.Sci.2003,100,2357.

[0197] (11)Hu,Y.-P.;Lin,S.-Y.;Huang,C.-Y.;Zulueta,M.M.L.;Liu,J.-Y.;Chang,W.;Hung,S.-C.Nat Chem 2011,3,557.

[0198] (12)Arungundram,S.;Al-Mafraji,K.;Asong,J.;Leach III,F.E.;Amster,I.J.;Venot,A.;JE,T.;Boons,G.J.J.Am.Chem.Soc.2009,131,17394.

[0199] (13)Schworer,R.;Zubkova,O.V.;Turnbull,J.E.;Tyler,P.C.Chem.Eur.J.2013,19,6817.

[0200] (14)Zong,C.;Huang,R.;Condac,E.;Chiu,Y.;Xiao,W.;Li,Z.Q.;Lu,W.;Ishihara,M.;Wang,S.;Ramiah,A.;Stickney,M.;Azadi,P.;Amster,I.J.;Moremen,K.W.;Wang,L.;Sharp,J.S.;Boons,G.-J.J.Am.Chem.Soc.2016,138,13059.

[0201] (15)Hansen,S.U.;Miller,G.J.;Cole,C.;Rushton,G.;Avizienyte,E.;Jayson,G.C.;Gardiner,J.M.Nat Commun 2013,4:2016,doi:10.1038/ncomms3016.

[0202] (16)Xu,Y.;Masuko,S.;Takieddin,M.;Xu,H.;Liu,R.;Jing,J.;Mousa,S.A.;Linhardt,R.J.;Liu,J.Science 2011,334,498.

[0203] (17)Xu,Y.;Cai,C.;Chandarajoti,K.;Hsieh,P.;Lin,Y.;Pham,T.Q.;Sparkenbaugh,E.M.;Sheng,J.;Key,N.S.;Pawlinski,R.L.;Harris,E.N.;Linhardt,R.J.;Liu,J.Nat Chem Biol 2014,10,248.

[0204] (18)Thacker,B.E.;Seamen,E.;Lawrence,R.;Parker,M.W.;Xu,Y.;Liu,J.;Vander,K.C.W.;Esko,J.D.ACS Chem.Biol.2016,11,971.

[0205] (19)Lindahl,U.;Backstrom,G.;Thunberg,L.;Leder,I.G.Proc.Natl.Acad.Sci.1980,77,6551.

[0206] (20)Shukla,D.;Liu,J.;Blaiklock,P.;Shworak,N.W.;Bai,X.;Esko,J.D.;Cohen,G.H.;Eisenberg,R.J.;Rosenberg,R.D.;Spear,P.G.Cell1999,99,13.

[0207] (21)Kamimura,K.;Rhodes,J.M.;Ueda,R.;McNeely,M.;Shukla,D.;Kimata,K.;Spear,P.G.;Shworak,N.W.;Nakato,H.J.Cell Biol.2004,166,1069.

[0208] (22)Tecle,E.;Diaz-Balzac,C.A.;Bulow,H.E.G3(Bethesda)2013,3,541.

[0209] (23)Tsau,C.;Ito,M.;Gromova,A;Hoffman,M.P.;Meech,R.;Makarenkova,H.P.Development 2011,138,3307.

[0210] (24)Petitou,M.;van Boeckel,C.A.A.Angew.Chem.Int.Ed.2004,43,3118.

[0211] (25)Liu,J.;Shriver,Z.;Pope,R.M.;Thorp,S.C.;Duncan,M.B.;Copeland,R.J.;Raska,C.S.;Yoshida,K.;Eisenberg,R.J.;Cohen,G.;Linhardt,R.J.;Sasisekharan,R.J.Biol.Chem.2002,277,33456.

[0212] (26)Liu,J.;Pedersen,L.C.Appl.Microbiol.Biotechnol.2007,74,263.

[0213] (27)Chen,J.;Avci,F.Y.;Muñoz,E.M.;McDowell,L.M.;Chen,M.;Pedersen,L.C.;Zhang,L.;Linhardt,R.J.;Liu,J.J.Biol.Chem.2005,280,42817.

[0214] (28)Zhang,Z.;McCallum,S.A.;Xie,J.;Nieto,L.;Corzana,F.;Jiménez-Barbero,J.;Chen,M.;Liu,J.;Linhardt,R.J.J Am Chem Soc 2008,130,12998.

[0215] (29)Atha,D.H.;Lormeau,J.-C.;Petitou,M.;Rosenberg,R.D.;Choay,J.Biochemistry 1985,24,6723.

[0216] (30)Hsieh,P.-H.;Thieker,D.F.;Guerrini,M.;Woods,R.J.;Liu,J.Sci Rep 2016,6,29602;doi:10.1038/srep29602.

[0217] (31)Jin,L.;Abrahams,P.;Skinner,R.;Petitou,M.;Pike,R.N.;Carrell,R.W.Proc.Natl.Acad.Sci.1997,94,14683.

[0218] (32)Guerrini,M.;Elli,S.;Mourier,P.;Rudd,T.R.;Gaudesi,D.;Casu,B.;

Boudier,C.;Torri,G.;Viskov,C.Biochem.J.2013,449,343.

[0219] (33)Guerrini,M.;Mourier,P.A.;Torri,G.;Viskov,C.Glycoconj.J.2014,31,409.

[0220] (34)Liu,J.;Shworak,N.W.;Sinaÿ,P.;Schwartz,J.J.;Zhang,L.;Fritze,L.M.S.;Rosenberg,R.D.J.Biol.Chem.1999,274,5185.

[0221] (35)Xu,D.;Moon,A.;Song,D.;Pedersen,L.C.;Liu,J.Nat Chem Biol2008,4,200.

[0222] (36)Langdown,J.;Belzar,K.J.;Savory,W.J.;Baglin,T.P.;Huntington,J.A.J.Mol.Biol.2009,386,1278.

[0223] (37)Moon,A.F.;Xu,Y.;Woody,S.;Krahn,J.M.;Linhardt,R.J.;Liu,J.;Pedersen,L.C.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2012,109,5256.

[0224] (38)Moon,A.;Edavettal,S.C.;Krahn,J.X.;Munoz,E.M.;Negishi,M.;Linhardt,R.J.;Liu,J.;Pedersen,L.C.J.Biol.Chem.2004,279,45185.

[0225] (39)deAgostini,A.I.;Dong,J.-C.;de Vantery Arrighi,C.;Ramus,M.-A.;Dentand-Quadri,I.;Thanlmann,S.;Ventura,P.;Ibecheole,V.;Monge,F.;Fischer,A.-M.;HajMohammadi,S.;Shworak,N.;Zhang,L.;Zhang,Z.;Linhardt,R.J.J.Biol.Chem.2008,283,28115.

[0226] (40)HajMohammadi,S.;Enjyoji,K.;Princivalle,M.;Christi,P.;Lech,M.;Beeler,D.L.;Rayburn,H.;Schwartz,J.J.;Barzegar,S.;de Agostini,A.I.;Post,M.J.;Rosenberg,R.D.;Shworak,N.W.J.Clin.Invest.2003,111,989.

[0227] (41)Mahe,I.;Chidac,J.;Helfer,H.;Nobel,S.J.Thromb.Haemost.2016,14,2017.

[0228] (42)McGowan,K.E.;Makari,J.;Diamantouros,A.;Bucci,C.;Rempel,P.;Selby,R.;Geerts,W.Blood 2016,127,1954.

[0229] (43)Kreimann,M.;Brandt,S.;Krauel,K.;Block,S.;Helm,C.;Weitschies,W.;Greinacher,A.;Delcea,M.Blood 2014,in press.

[0230] (44)Yang,J.;Hsieh,P.;Liu,X.;Zhou,W.;Zhang,X.;Zhao,J.;Xu,Y.;Zhang,F.;Linhardt,R.J.;Liu,J.Chem Comm 2017,53,1743.

[0231] (45)Kirschner,K.N.;Yongye,A.B.;Tschampel,S.M.;González-Outeiriño,J.;Daniels,C.R.;Foley,B.L.;Woods,R.J.J.Comput.Chem.2008,29,622.

[0232] (46)Xu,Y.;Cai,C.;Chandarajoti,K.;Hsieh,P.;Lin,Y.;Pham,T.Q.;Sparkenbaugh,E.M.;Sheng,J.;Key,N.S.;Pawlinski,R.L.;Harris,E.N.;Linhardt,R.J.;Liu,J.Nat Chem Biol 2014,10,248.

[0233] (47)Langdown,J.;Belzar,K.J.;Savory,W.J.;Baglin,T.P.;Huntington,J.A.J.Mol.Biol.2009,386,1278.

[0234] (48)Pettersen,E.F.;Goddard,T.D.;Huang,C.C.;Couch,G.S.;Greenblatt,D.M.;Meng,E.C.;Ferrin,T.E.J.Comp.Chem.2004,25,1605.

[0235] (49)Fiser,A.;Sali,A.Methods Enzymol 2003,374,461.

[0236] (50)Huang,C.C.;Meng,E.C.;Morris,J.H.;Pettersen,E.F.;Ferrin, T.E.Nucleic Acids Res.2014,42,w478.

[0237] (51)Yang,Z.;Lasker,K.;Schneidman-Duhovny,D.;Webb,B.;Huang,C.C.;Pettersen,E.F.;Goddard,T.D.;Meng,E.C.;Sali,A.;Ferrin,T.E.J.Struct.Biol.2012,179,269.

[0238] (52)Case,D.A.;Darden,T.A.;Cheatham III,T.E.;Simmerling,C.L.;Wang,J.;Duke,R.E.;Luo,R.;Walker,R.C.;Zhang,W.;Merz,K.M.;Roberts,B.;Hayik,S.;Roitberg,A.;Seabra,G.;Swails,J.;Goetz,A.W.;Kolossváry,I.;Wong,K.F.;Paesani,F.;Vanicek,J.;Wolf,R.M.;Liu,J.;Wu,X.;Brozell,S.R.;Steinbrecher,T.;Gohlke,H.;Cai,Q.;Ye,X.;Wang,J.;Hsieh,M.-J.;Cui,G.;Roe,D.R.;Mathews,D.H.;Seetin,M.G.;Salomon-Ferrer,R.;Sagui,C.;Babin,V.;Luchko,T.;Gusarov,S.;Kovalenko,A.;Kollman,P.A.2014,University of California.

[0239] (53)Kirschner,K.N.;Yongye,A.B.;Tschampel,S.M.;González-Outeiriño,J.;Daniels,C.R.;Foley,B.L.;Woods,R.J.J.Comput.Chem.2008,29,622.

[0240] (54)Singh,A.;Tessier,M.B.;Pederson,K.;Wang,X.;Venot,A.P.;Boons,G.-J.;Prestegard,J.H.;Woods,R.J.Can.J.Chem.2016,10.1139/cjc.

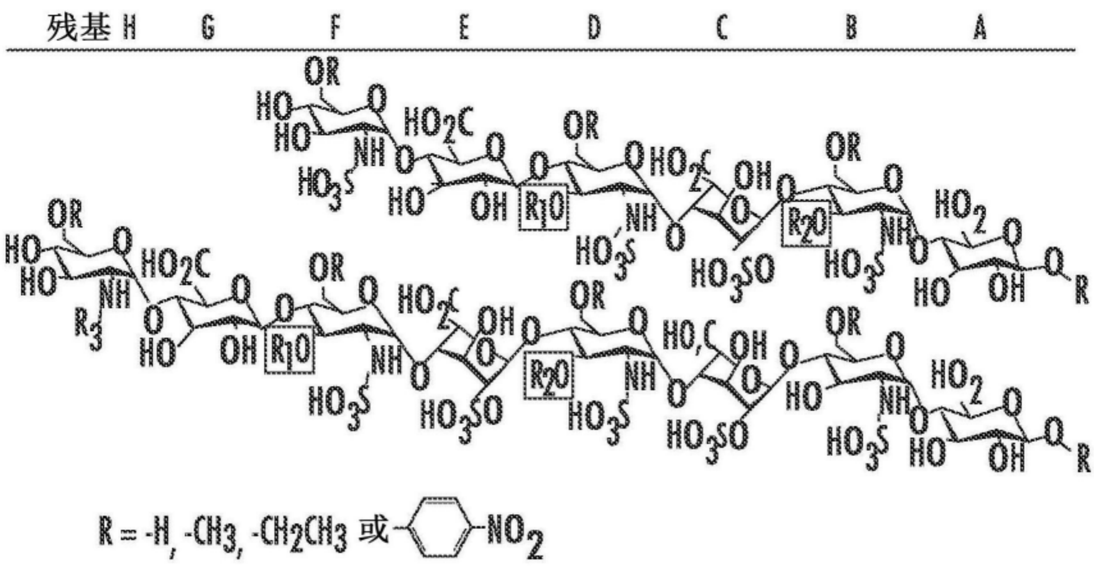
[0241] (55)Hsieh,P.-H.;Thieker,D.F.;Guerrini,M.;Woods,R.J.;Liu,J.Sci Rep 2016,6,29602;doi:10.1038/srep29602.

[0242] (56)Darden,T.;York,D.;Pedersen,L.C.J.Chem.Phys.1993,98,10089.

[0243] (57)Kollman,P.A.;Massova,I.;Reyes,C.;Kuhn,B.;Huo,S.;Chong,L.;Lee,M.;Lee,T.;Duan,Y.;Wang,W.;Donini,O.;Cieplak,P.;Srinivasan,J.;Case,D.A.;Cheatham,T.E.r.Acc.Chem.Res.2000,33,889.

[0244] (58)Onufriev,A.;Bashford,D.;Case,D.A.Proteins 2004,55,383.

[0245] (59)Humphrey,W.;Dalke,A.;Schulten,K.J.Mol.Graph.1996,14,33.



六糖(6-链节):

化合物 1: $R = R_1 = -H; R_2 = -SO_3H$

化合物 2: $R_1 = -H; R = R_2 = -SO_3H$

化合物 3: $R = R_1 = R_2 = -SO_3H$

化合物 7: $R = R_1 = R_2 = -H$

化合物 8: $R = R_1 = -SO_3H; R_2 = -H$

八糖(8-链节):

化合物 4: $R = R_1 = -H; R_2 = -R_3 = -SO_3H$

化合物 5: $R_1 = -H; R = R_2 = -R_3 = -SO_3H$

化合物 6: $R = R_1 = R_2 = R_3 = -SO_3H$

化合物 9: $R = R_1 = R_2 = -H; R_3 = -Ac$

化合物 10: $R = R_3 = -SO_3H; R_1 = -R_2 = -H$

化合物 11: $R_2 = -H; R_1 = -SO_3H; R_3 = -Ac\ R = -SO_3H$

图1A

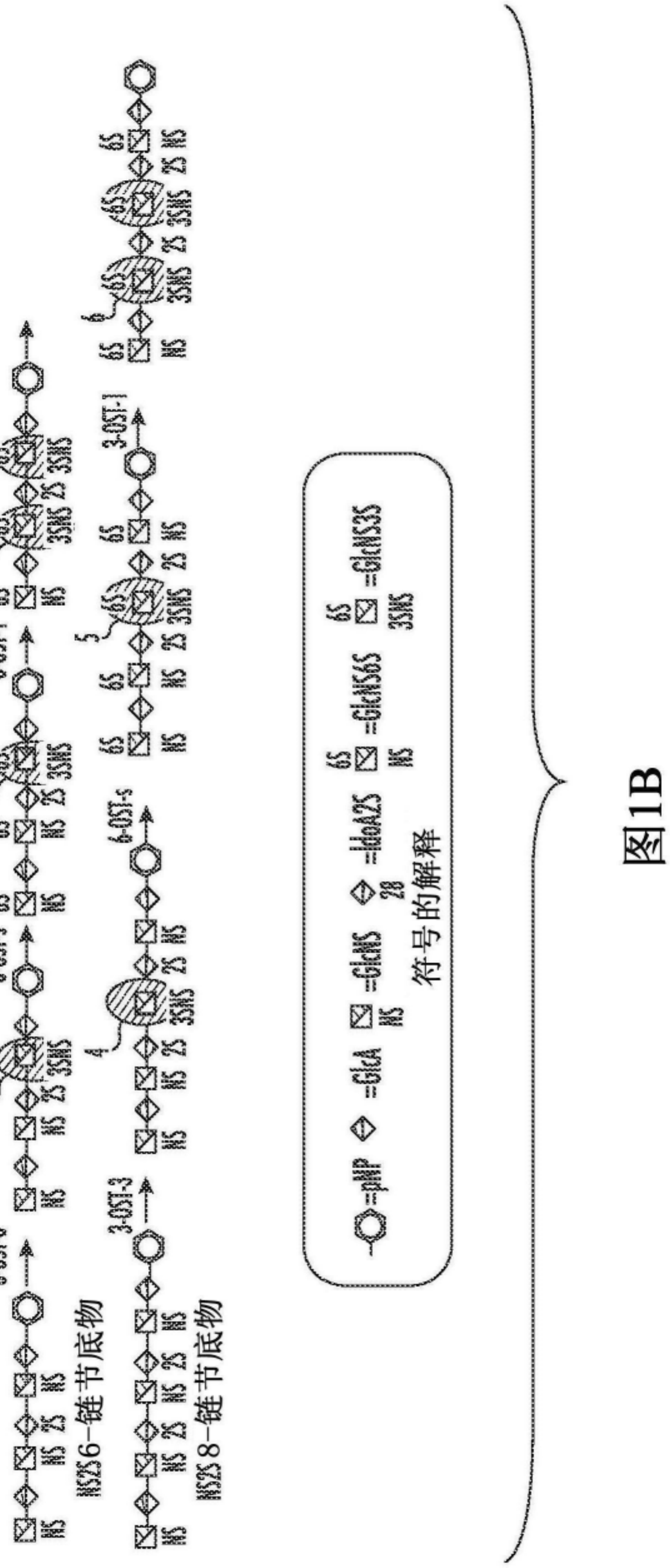
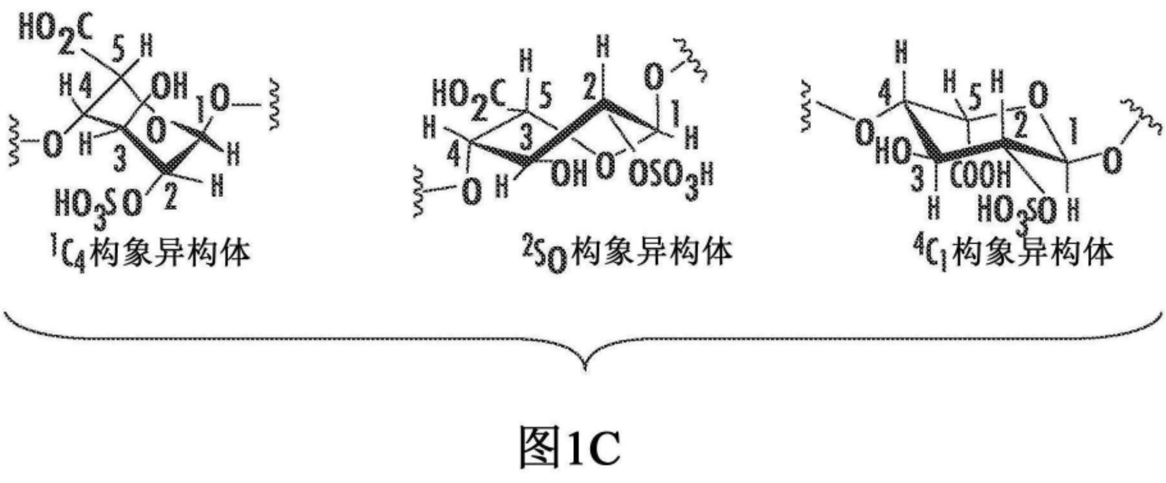
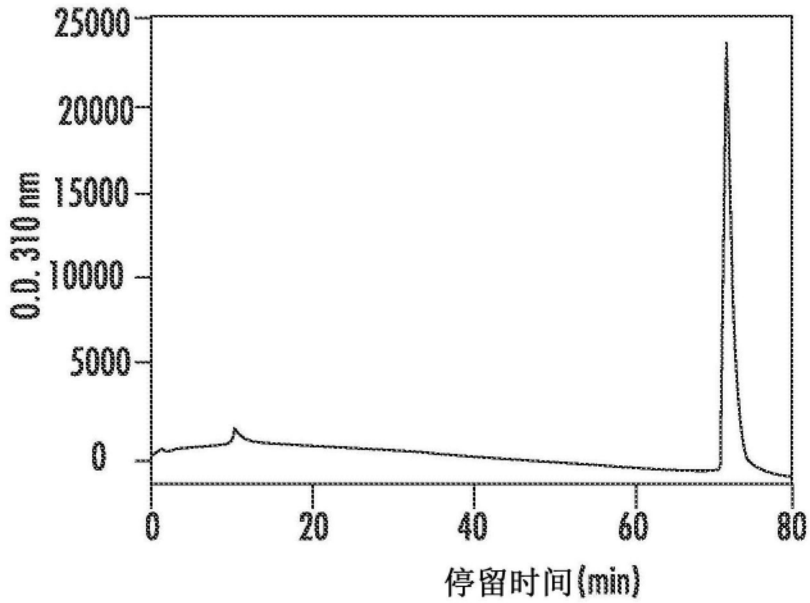

NS2S 6-链节底物
NS2S 8-链节底物
3-OST-3
6-OST-s
3-OST-1
符号的解释
=pNP
=GlcA
=GlcNS
=IdoA2S
=GlcNS6S
=GlcNS3S
图1B

图1B



$^1C_4$构象异构体
^2S_O构象异构体
$^4C_1$构象异构体
图1C

图1C



O.D. 310 nm
25000
20000
15000
10000
5000
0
20
40
60
80
停留时间(min)

图2A

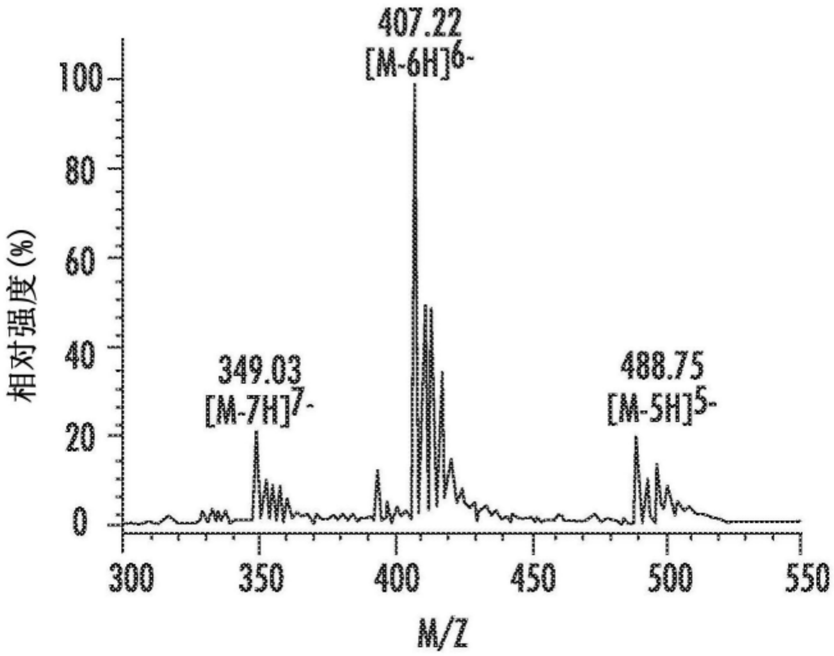

407.22
[M-6H]6-
349.03
[M-7H]7-
488.75
[M-5H]5-
相对强度 (%)
100
80
60
40
20
0
300
350
400
450
500
550
M/Z

图2B

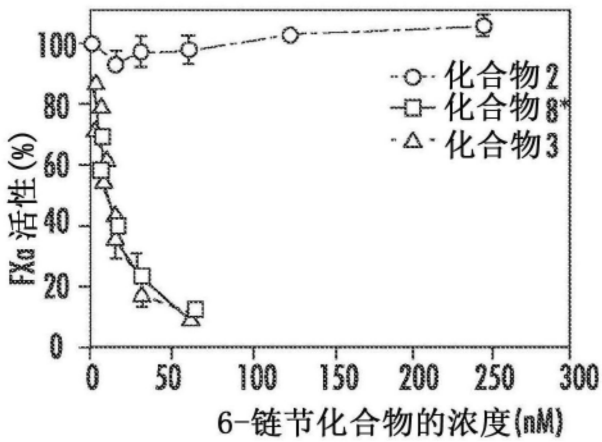

化合物 2
化合物 8*
化合物 3
FXa 活性 (%)
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
300
6-链节化合物的浓度(nM)

图3A

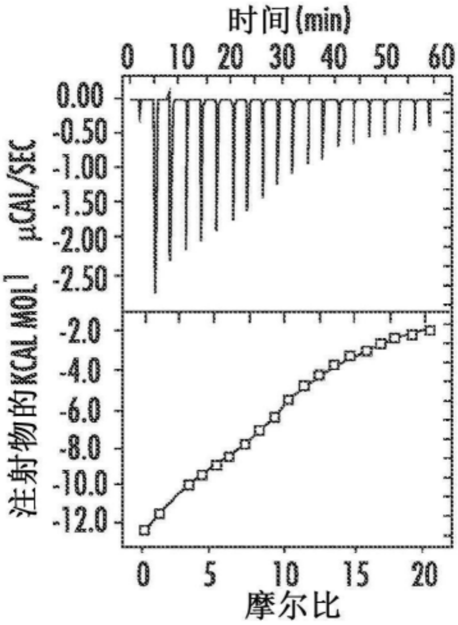

时间(min)
0 10 20 30 40 50 60
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
-2.00
-2.50
μCAL/SEC
注射物的KCAL MOL⁻¹
-2.0
-4.0
-6.0
-8.0
-10.0
-12.0
0 5 10 15 20
摩尔比

图3B

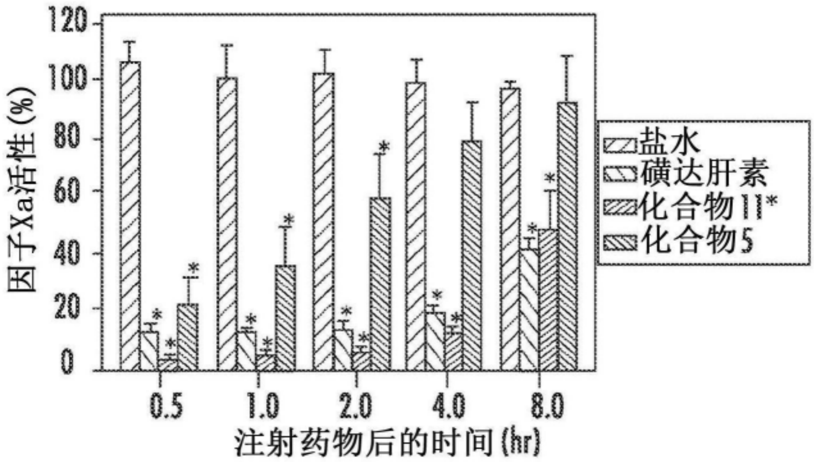

120
100
80
60
40
20
0
因子Xa活性(%)
盐水
磺达肝素
化合物11*
化合物5
0.5 1.0 2.0 4.0 8.0
注射药物后的时间(hr)

图3C

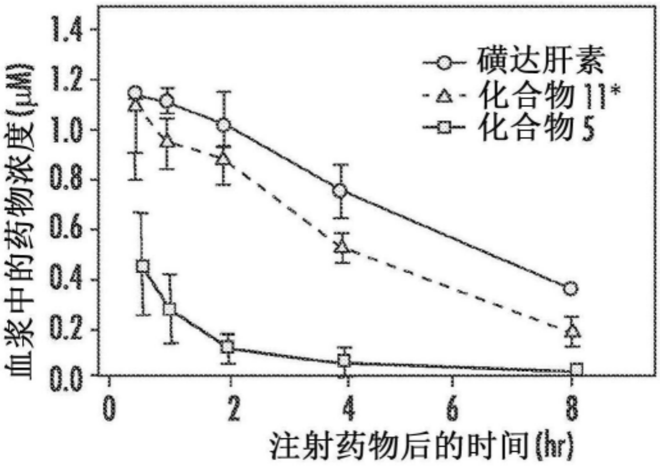


图3D

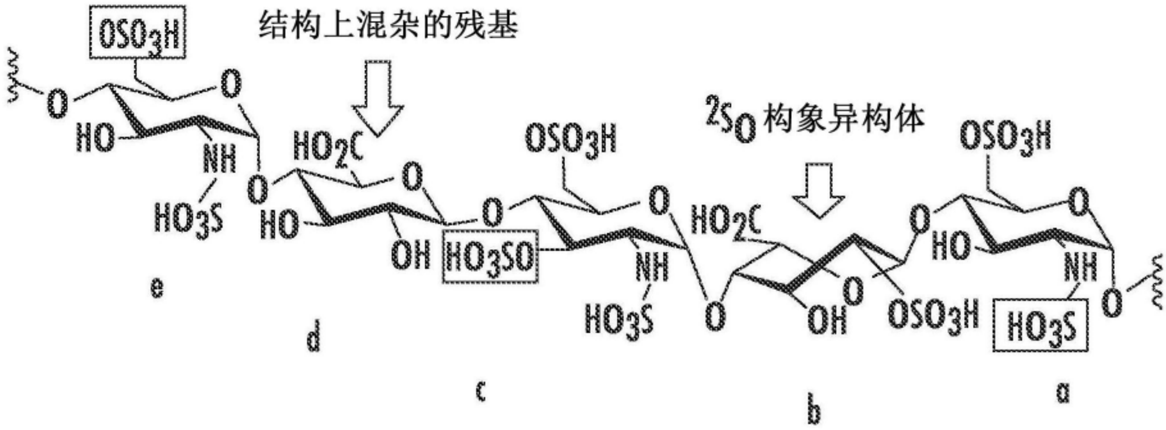


图4A

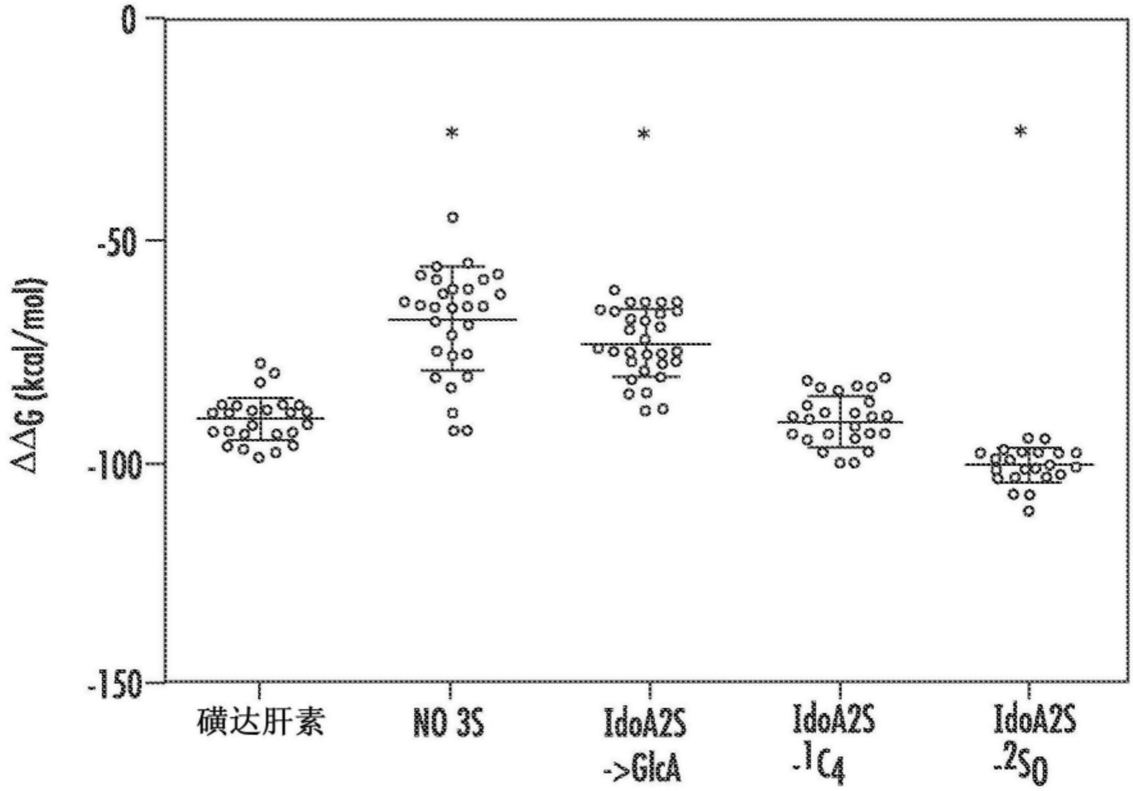

0
-50
-100
-150
ΔΔG (kcal/mol)
*
*
*
磺达肝素
NO 3S
IdoA2S
->GlcA
IdoA2S
-1C4
IdoA2S
-2S0

图4B

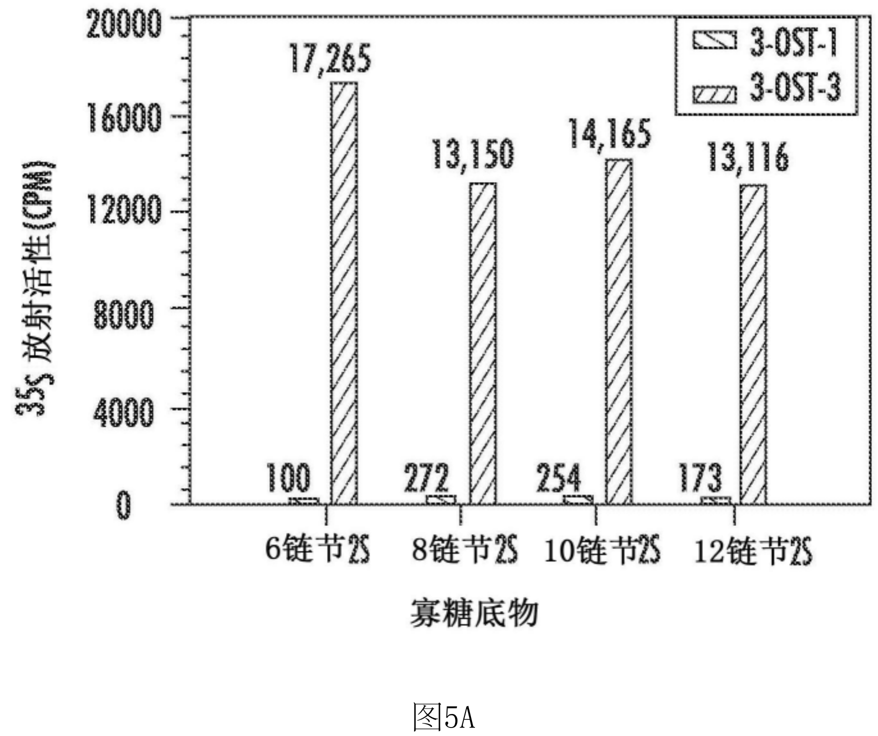

20000
16000
12000
8000
4000
0
35S 放射活性(CPM)
3-OST-1
3-OST-3
17,265
13,150
14,165
13,116
100
272
254
173
6链节2S
8链节2S
10链节2S
12链节2S
寡糖底物

图5A

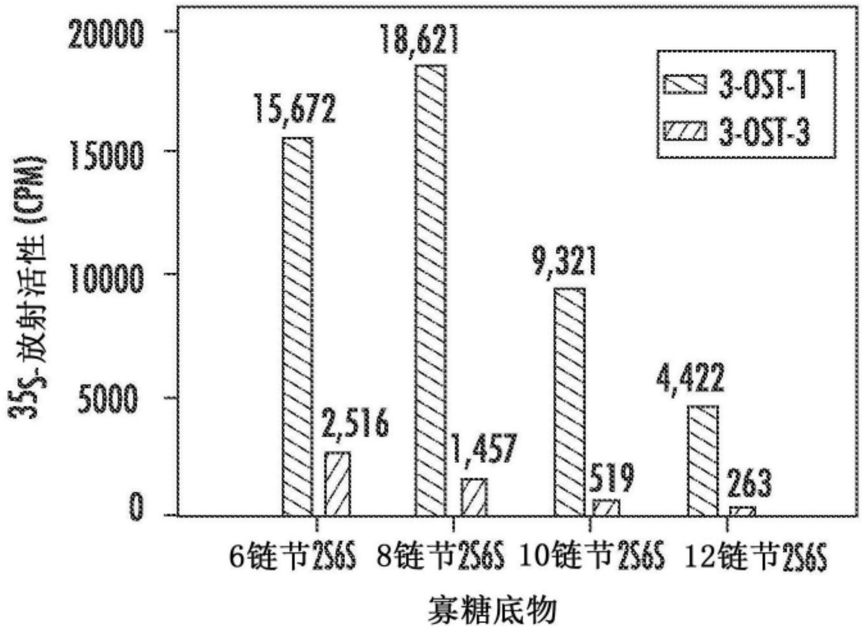
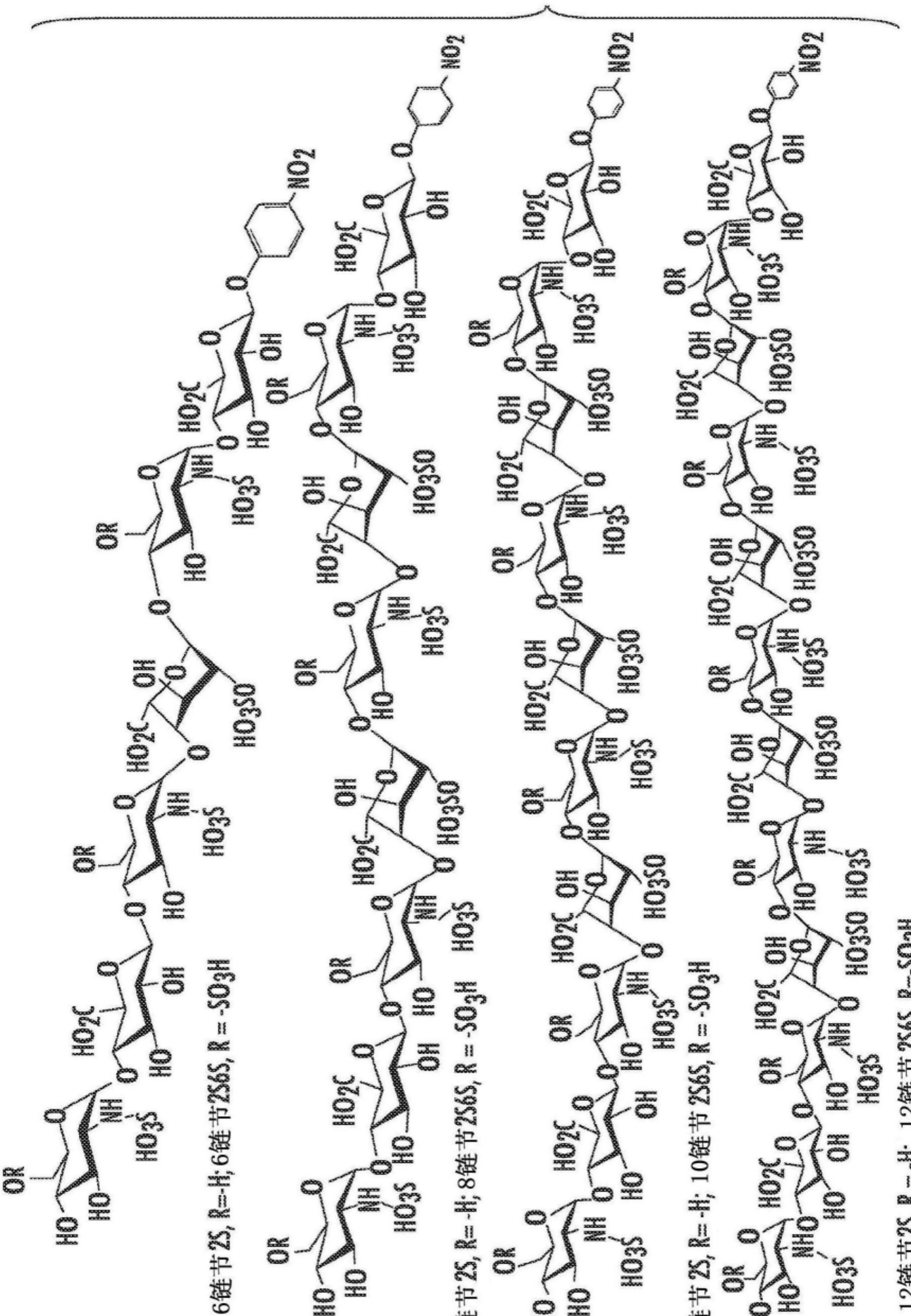

20000
15000
10000
5000
0
35S-放射活性 (CPM)
15,672
18,621
9,321
4,422
2,516
1,457
519
263
3-OST-1
3-OST-3
6链节2S6S
8链节2S6S
10链节2S6S
12链节2S6S
寡糖底物

图5B



6链节2S, R=-H; 6链节2S6S, R = -SO_3H

8链节2S, R= -H; 8链节2S6S, R = -SO_3H

10链节2S, R= -H; 10链节2S6S, R = -SO_3H

12链节2S, R = -H; 12链节2S6S, R=-SO_3H

图5C

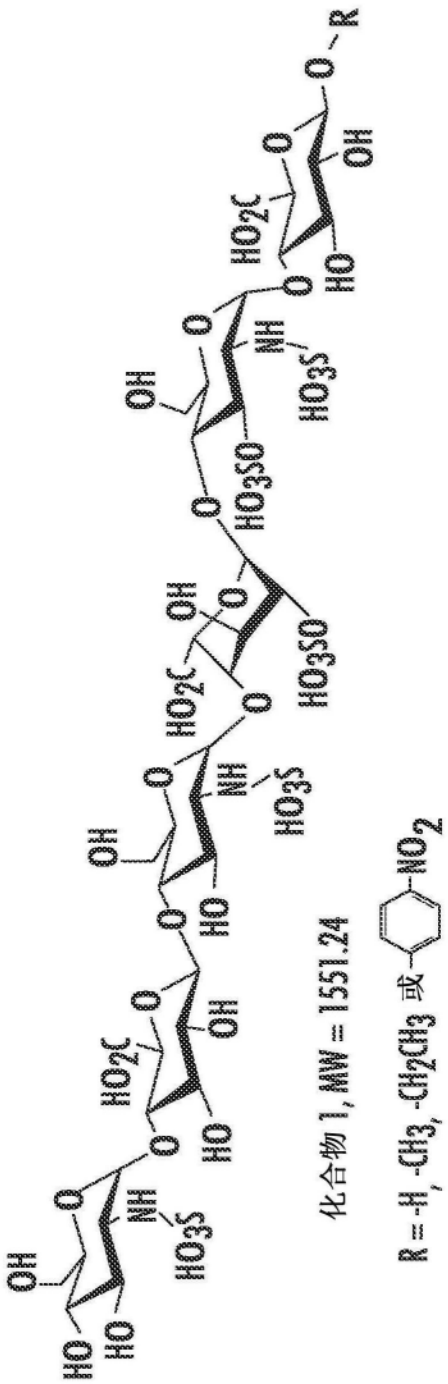


图6A

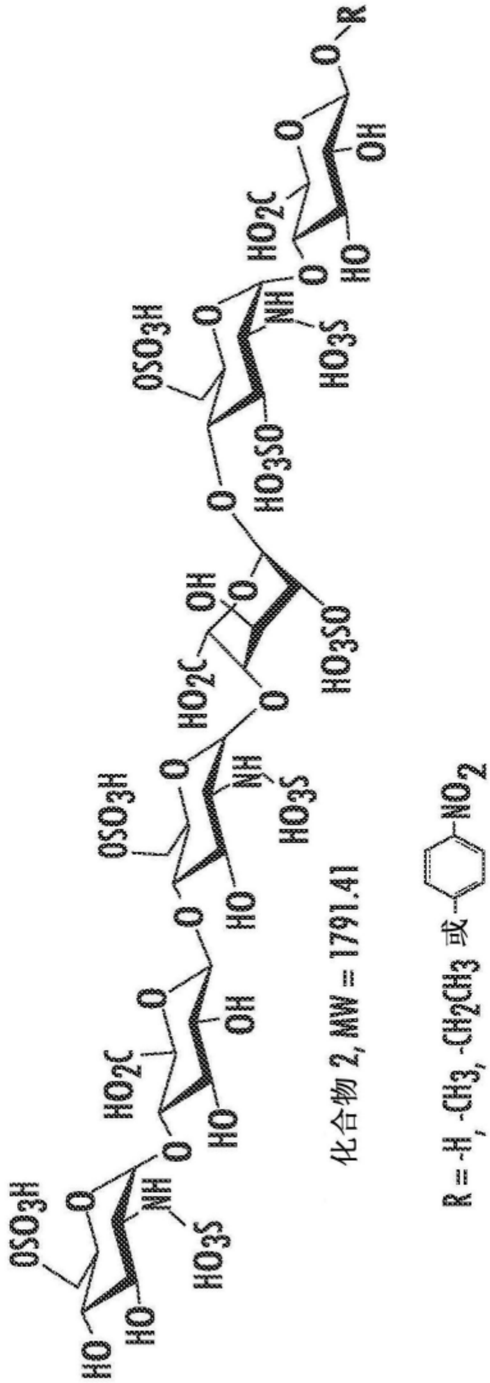

化合物 2, MW = 1791.41
R = -H, -CH3, -CH2CH3 或
NO2
O-R
OH
HO2C
HO
OSO3H
NH
HO3S
HO3SO

图6B

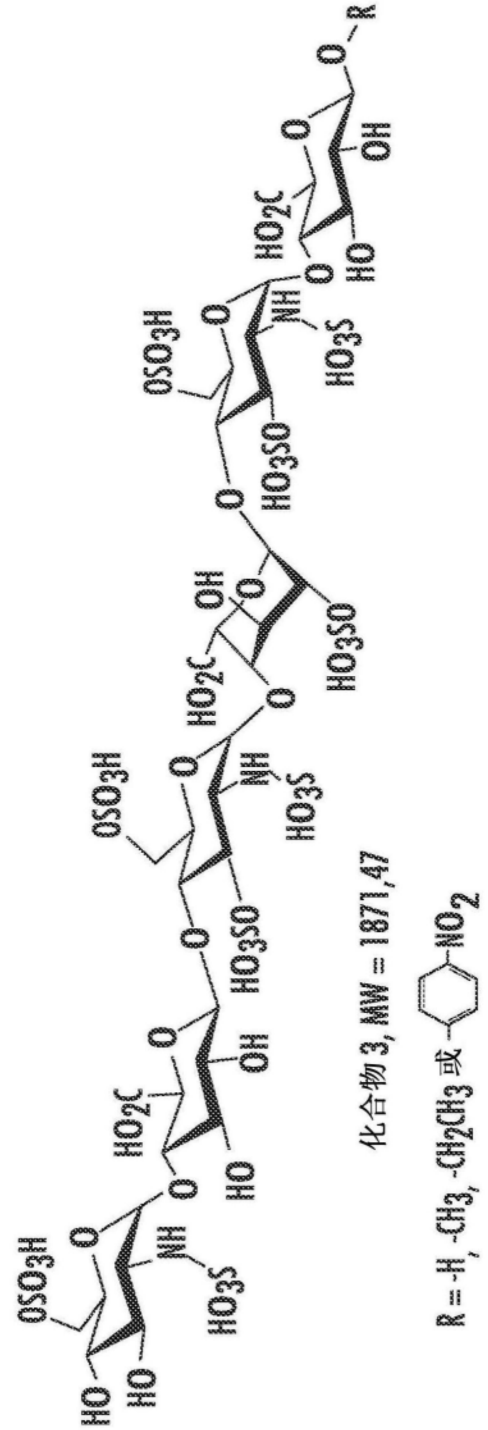


图6C

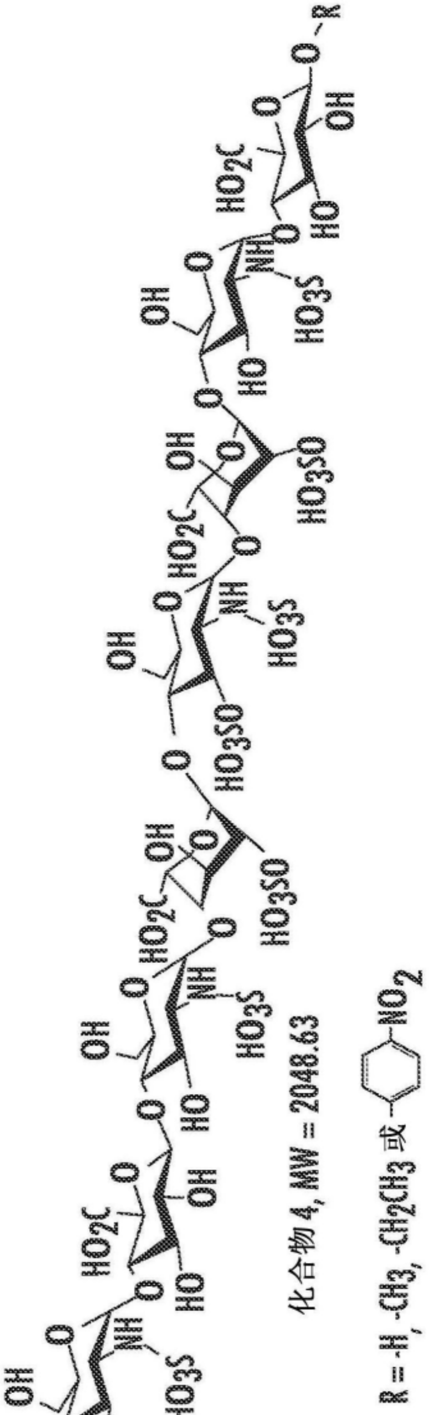


图6D

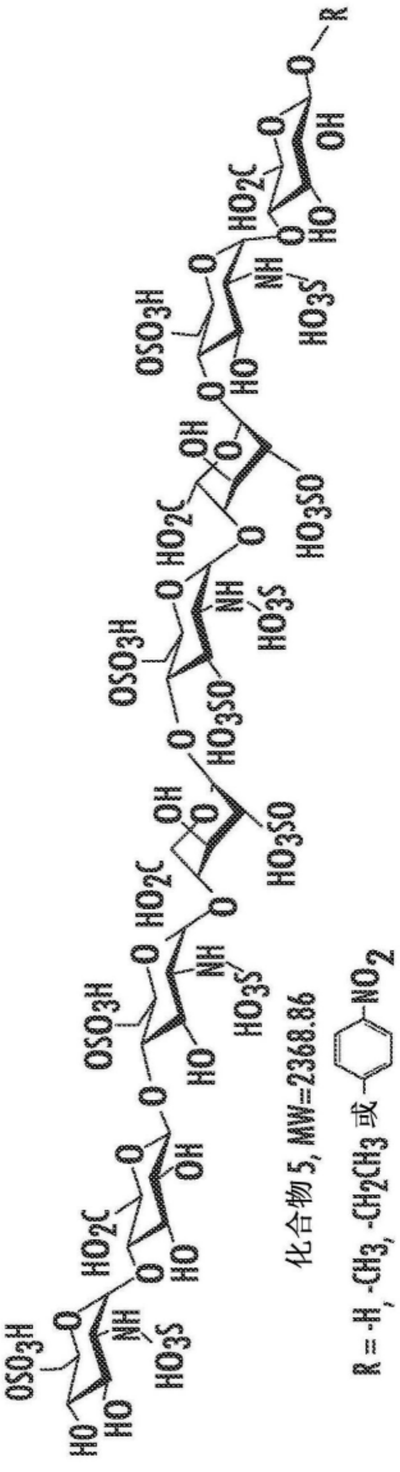


图6E

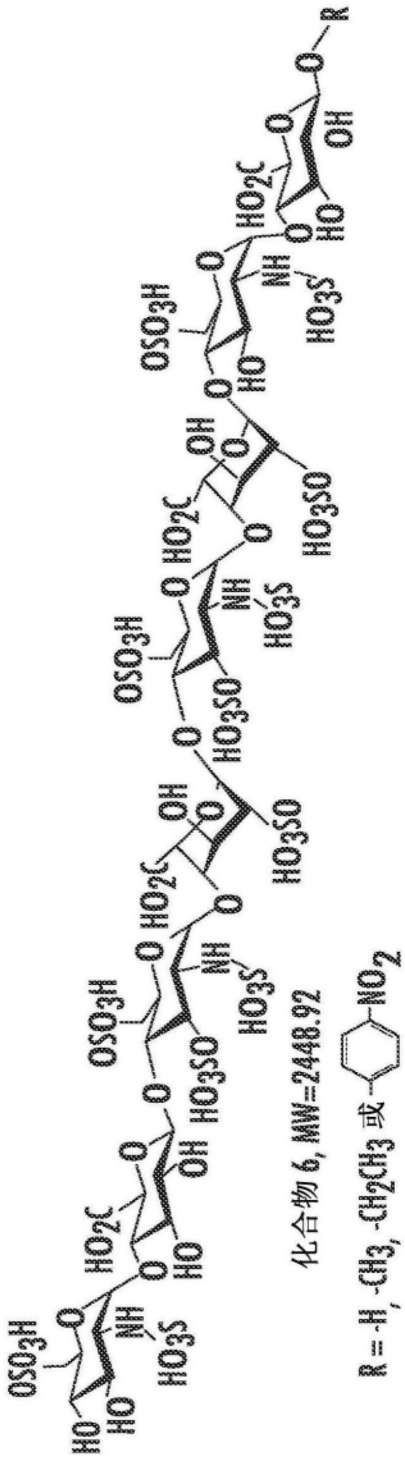


图6F

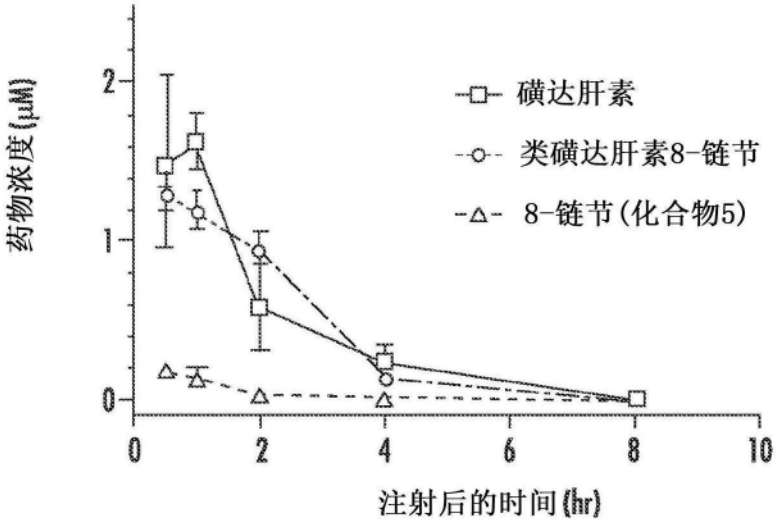

药物浓度(μM)
2
1
0
0
2
4
6
8
10
注射后的时间(hr)
磺达肝素
类磺达肝素8-链节
8-链节(化合物5)

图7A

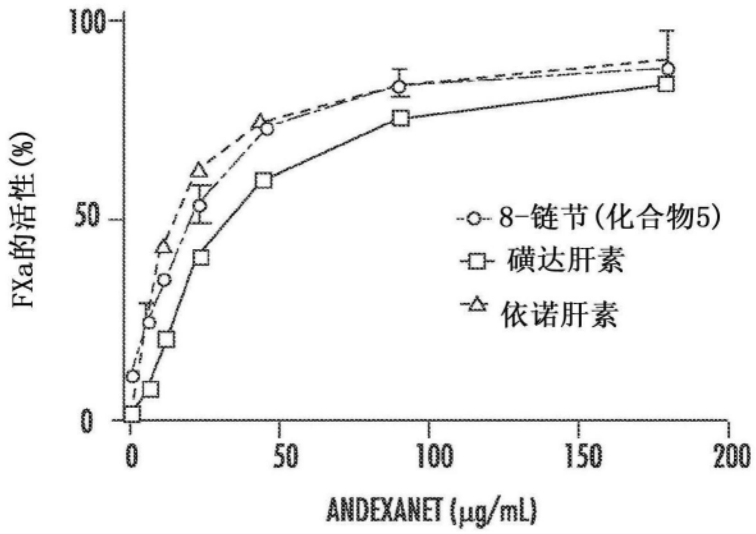

FXa的活性(%)
100
50
0
0
50
100
150
200
ANDEXANET (μg/mL)
8-链节(化合物5)
磺达肝素
依诺肝素

图7B

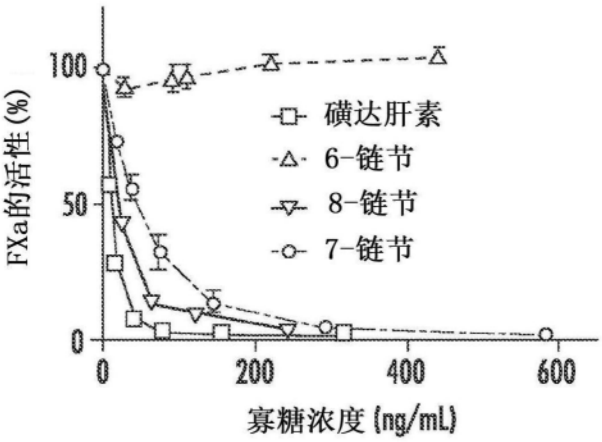


图8A

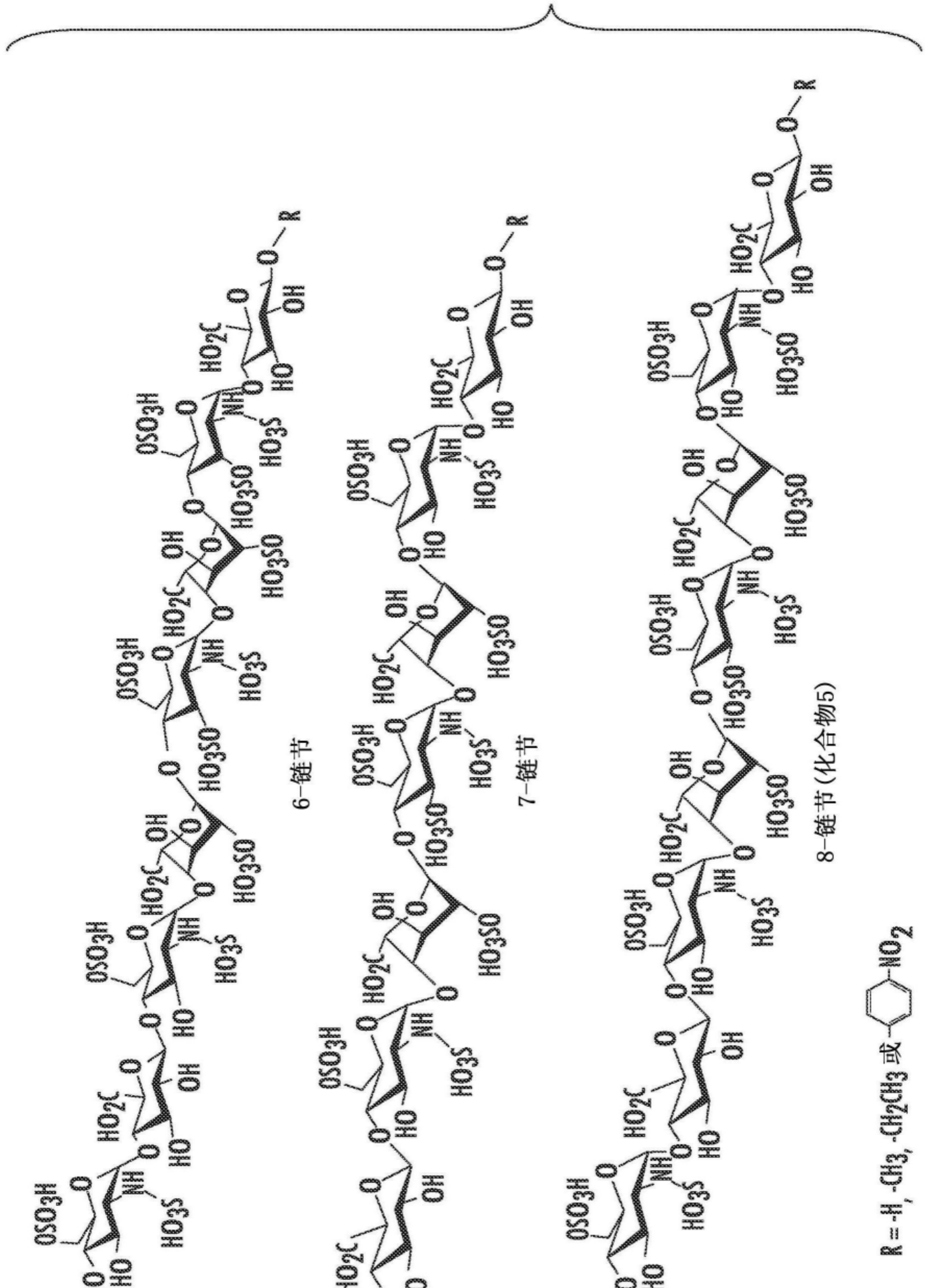


图8B

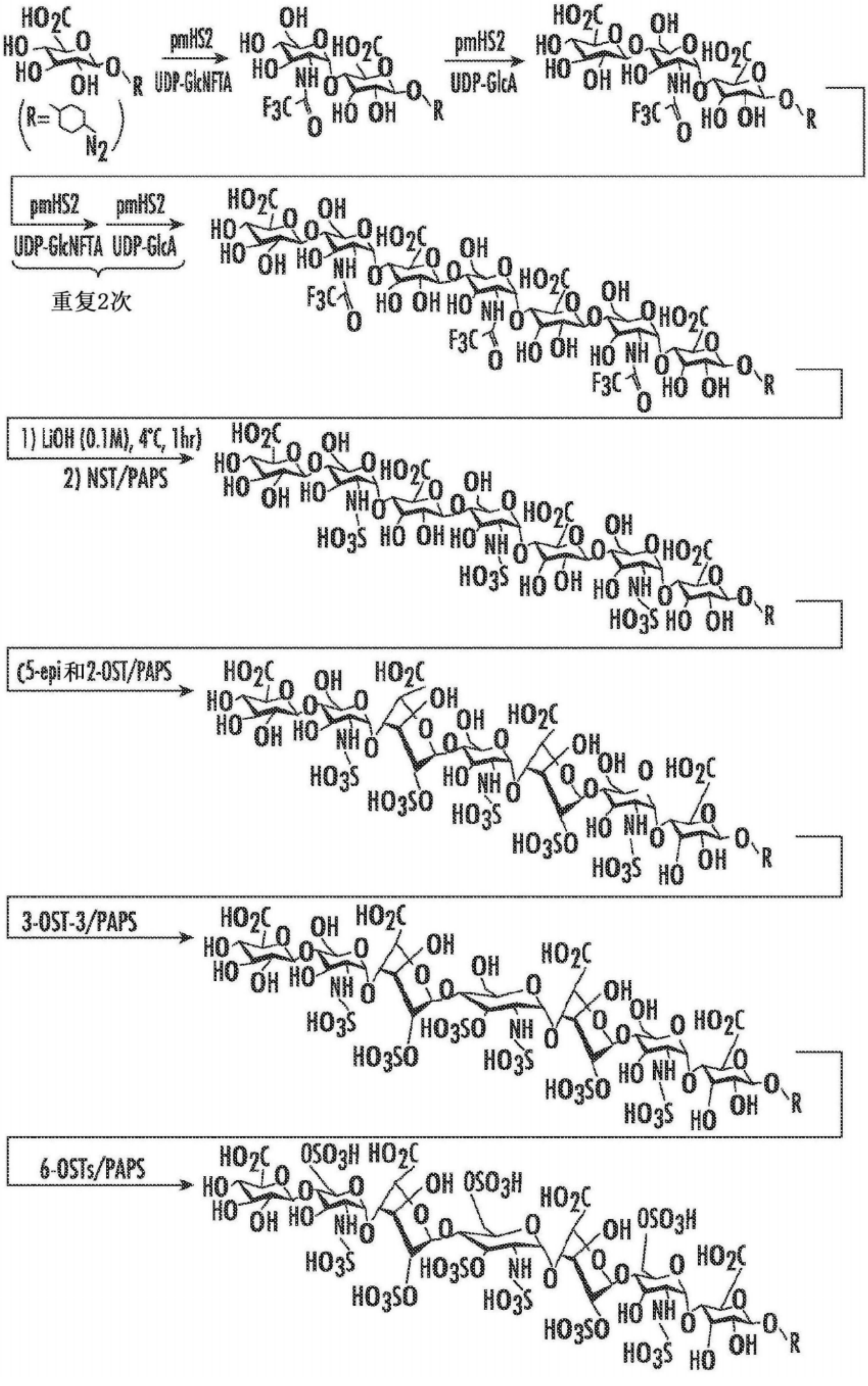

pmHS2
UDP-GlcNFTA
pmHS2
UDP-GlcA
pmHS2
UDP-GlcNFTA
pmHS2
UDP-GlcA
重复2次
1) LiOH (0.1M), 4°C, 1hr)
2) NST/PAPS
C5-epi和2-OST/PAPS
3-OST-3/PAPS
6-OSTs/PAPS

图8C